

***Biochemische und strukturelle
Charakterisierung der Regulation von
Sirtuinen durch AROS und
Kleinmoleküle***

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin

der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

an der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften

der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Sandra Kristin Weiß

aus *Bützow*

Bayreuth, 2021

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2016 bis März 2021 in Bayreuth am Lehrstuhl Biochemie unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Clemens Steegborn angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 16.03.2021

Zulassung durch die Promotionskommission: 24.03.2021

Wissenschaftliches Kolloquium: 29.07.2021

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Matthias Breuning

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. C. Steegborn (Gutachter)

Prof. Dr. B. Höcker (Gutachterin)

Prof. Dr. C. Unverzagt (Vorsitz)

Prof. Dr. G. Begemann

Liste der Veröffentlichungen

- 2019 You, W., Zheng, W., **Weiss, S.**, Chua, K. F., & Steegborn, C. (2019). Structural basis for the activation and inhibition of Sirtuin 6 by quercetin and its derivatives. *Scientific reports*, 9(1), 1-11.
- 2021 **Weiss, S.**, Adolph, R., Schweimer, K., Di Fonzo, A, & Steegborn, C. (in preparation) Molecular mechanism of Sirtuin 1 modulation by the AROS protein.
- 2021 **Weiss, S.**, You, W., Steegborn, C. (in preparation) Structures of Sirtuin3-fragment complexes from crystallographic fragment screening.

Konferenzen

- 2016 Vortrag bei dem 19. Heart of Europe Bio-Crystallography Meeting in Warburg mit dem Titel "Molecular studies of sirtuin regulation"
- 2018 Vortrag bei dem 21. Heart of Europe Bio-Crystallography Meeting in Quedlinburg mit dem Titel "Molecular studies on Sirt1 regulation by its binding partner AROS"

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	IX
Zusammenfassung.....	XII
Abstract.....	XIV
1 Einleitung.....	1
1.1 Reversible Proteinacetylierung	1
1.2 Sirtuine NAD ⁺ -abhängige Deacylasen.....	2
1.2.1 Isoformen, Lokalisation und Funktion der Säugetiersirtuine	2
1.2.2 Struktureller Aufbau der Sirtuine	5
1.2.3 Katalytischer Mechanismus und Deacylaseaktivitäten der Sirtuine	7
1.3 Regulation von Sirtuinen	10
1.3.1 Regulation durch physiologische Kleinmoleküle	11
1.3.2 Regulation durch pharmakologische Kleinmoleküle.....	12
1.3.3 Regulation durch Proteine.....	15
1.3.4 Der Sirt1 Interaktionspartner AROS	17
1.4 Zielsetzung	18
2 Material und Methoden	20
2.1 Material.....	20
2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Standards	20
2.1.2 Bakterienstämme	20
2.1.3 Nährmedien, Antibiotika und Induktor	21
2.1.4 Oligonukleotide	22
2.1.5 Plasmide	23
2.2 Mikrobiologische Methoden.....	23
2.2.1 Sterilisation	23
2.2.2 Transformation kompetenter Zellen mittels Hitzeschock.....	24

2.2.3	Heterologe Überexpression rekombinanter Proteine	24
2.3	Molekularbiologische Methoden	25
2.3.1	Polymerasekettenreaktion.....	25
2.3.2	Agarosegelelektrophorese	26
2.3.3	Modifikation von DNA-Fragmenten	26
2.3.4	Reinigung der PCR-Produkte und der Plasmid-DNA	26
2.3.5	Ligation von DNA-Fragmenten.....	26
2.3.6	DNA-Sequenzierung	27
2.4	Biochemische Methoden	27
2.4.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	27
2.4.2	Polyacrylamidgelelektrophorese	27
2.4.3	Färbung mit Coomassie-Blau.....	28
2.4.4	Diskontinuierliche native Protein-Gelelektrophorese.....	28
2.4.5	Zellaufschluss	28
2.4.6	Affinitätschromatographie	29
2.4.7	Proteolytische Entfernung des Affinitäts-tags.....	29
2.4.8	Anionenaustauschchromatographie.....	29
2.4.9	Konzentrierung von Proteinen.....	29
2.4.10	Größenausschlusschromatographie	30
2.4.11	Reinigung von rekombinanten Proteinen.....	30
2.4.12	Fluoreszenzbasierter Aktivitätsassay.....	33
2.4.13	Enzymgekoppelter Assay	34
2.4.14	Mikroskalierbare Thermophorese	36
2.4.15	Fluoreszenzbasiertes Denaturierungsexperiment (DSF)	36
2.4.16	Circulardichroismus	37
2.4.17	Detektion zugänglicher Sulfhydrylgruppen	37
2.4.18	Protein-Protein Quervernetzung	38

2.4.19	Massenspektrometrie	38
2.5	Bioinformatische Sequenzanalyse.....	39
2.6	Strukturbiologische Methoden	40
2.6.1	Kristallografie	40
2.6.2	NMR.....	43
3	Ergebnisse.....	45
3.1	Regulation von Sirtuinen durch Quercetin	45
3.2	Screening von Ligandenfragmenten gegen Sirt3.....	48
3.3	Das Protein <i>Active Regulator of Sirt1</i>	53
3.3.1	Bioinformatische Analyse von AROS.....	54
3.3.2	Expression, Reinigung und Renaturierung von AROS.....	55
3.3.3	Analyse der Sekundär- und Tertiärstruktur des renaturierten AROS	60
3.4	Interaktion von AROS mit Sirt1	65
3.4.1	Stabilisierung des Sirt1/AROS-Komplexes	65
3.4.2	AROS inhibiert Sirt1 durch Konkurrenz mit dem Acylsubstrat.....	67
3.4.3	Analyse der Interaktionsfläche des Sirt1/AROS-Komplexes.....	70
3.4.4	Regulation der Sirt1/AROS-Interaktion durch PTMs	78
3.4.5	Spezifität Isoformen	79
4	Diskussion.....	87
4.1	Der Sirt2 Inhibitor Quercetin	87
4.2	Neue Bindungsstellen für Kleinmoleküle in Sirt3	89
4.3	AROS ist ein flexibles Protein mit Potential zur Strukturinduzierung	91
4.4	AROS inhibiert Sirt1 durch Kompetition mit dem Acyl-Peptidsubstrat	94
4.5	AROS verhindert Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes.....	95
4.6	Wie wird die Sirt1/AROS-Interaktion reguliert?.....	100
5	Literaturverzeichnis	102
6	Anhang.....	114

6.1	DNA-Sequenzen.....	114
6.2	Aminosäuresequenzen.....	115
6.3	Vektorkarten	116
6.4	Reinigung von Sirt1-Konstrukten.....	118
6.5	Seitenkettenuordnung von AROS.....	119
7	Danksagung	120
8	(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen	122

Abkürzungen

2-O-AADPR	2-O-Acetyl-ADP-Ribose
A	Absorption
AceCS2	Acetyl-CoA-Synthetase 2
ACN	Acetonitril
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicilin
APS	Ammoniumpersulfat
AROS	<i>active regulator of hSirt1</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i> , Fadenwurm
Cam	Chloramphenicol
CD	Circulardichroismus
CPS1	Carbamoylphosphat-Synthetase I
Cy5	Cyan5
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> , Fruchtfliege
DBC1	<i>deleted in breast cancer 1</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSF	Fluoreszenzbasiertes Denaturierungsexperiment, <i>Differential Scanning Fluorometry</i>
DSSO	Disuccinimidylsulfoxid
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzonsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI-MS/MS	<i>electrospray ionization tandem mass spectrometry</i>
ESA	<i>essential for Sirt1 activity</i>
FdL	Fluor-de-Lys
FE	Fluoreszenzeinheiten

FITC	Fluorescein-5-Isothiocyanat
FOXO	Forkhead-Box-Proteine
GDH	Glutamatdehydrogenase
GdnHCl	Guanidinium-Hydrochlorid
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grünfluoreszierenden Protein
H1, 3, 4	Histon 1, 3, 4
HDCA	Histon-Deacetylasen
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i> , menschliche embryonale Nierenzellen
HIC1	<i>hypermethylated in cancer 1</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
IAA	Iodacetamid
IB	<i>inclusion bodies</i> , Einschlusskörperchen
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JNK	cJUN N-terminale Kinase 1
KAT	Lysin-Acetyltransferasen
K _D	Dissoziationskonstante
KDCA	Lysin-Deacetylasen
LB	<i>lysogeny broth</i>
mAU	milli Absorptionseinheiten (<i>absorption units</i>)
miniSirt1	Verkürztes, enzymatisch aktive und kristallisierbare Konstrukt von Sirt1
miniSirt1ex687	verlängertes Konstrukt von miniSirt1, welches C-terminal um 20 AS erweitert ist
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i> , Ziel des Rapamycins
MS	Massenspektrometrie
MST	mikroskalierte Thermophorese
MW	<i>molecular weight</i> , Molekulargewicht
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i> , Molekularmassengrenze
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NAM	Nicotinamid

NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernresonanz
OD	optische Dichte
PAT	Proteinacetyltransferasen
PDAC	Proteindeacetylasen
PEG	Polyethylenglykol
PGC-1 α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1α</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTM	posttranslationale Modifikationen
rDNA	Ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNAP	RNA Polymerase I
ROS	reaktive Sauerstoffradikale
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Bäckerhefe
SBD	STAC-Bindedomäne
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat) <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> , Größenausschluss-chromatographie
Sir2	<i>silent information regulator 2</i>
Sirt1-7	Sirtuinisoformen 1 bis 7 der Säugetiere
STAC	<i>sirtuin activating compound</i>
SUMO	<i>small Ubiquitin-related Modifier</i>
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TEV	Tobacco Etch Virus
TFE	Trifluorethanol
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Zusammenfassung

Sirtuine sind eine evolutionär hoch konservierte Familie der Histon-Deacetylasen. Sie katalysieren die Deacylierung von Acyllysine-Resten in Substratproteinen durch einen einzigartigen Mechanismus, der NAD⁺ als Cosubstrat benötigt. Dies macht Sirtuine zu metabolischen Sensoren. Diese Enzyme regulieren Stressreaktionen und Alterungsprozesse. Da sie in altersbedingten und metabolischen Erkrankungen involviert sind, ist die Regulation von Sirtuinen von medizinischem Interesse und besitzt therapeutisches Potenzial. In dieser Arbeit wurden neue Erkenntnisse zur endogenen Regulation von Sirtuinen durch das Protein AROS und zur Sirtuinmodulation durch Kleinmoleküle gewonnen.

Das Pflanzenflavonoid Quercetin hat im Gegensatz zur Sirt6-spezifischen Aktivierung eine inhibitorische Wirkung auf die anderen Sirtuinisoformen. Die molekularen Grundlagen der Quercetin-vermittelten Inhibition konnte mit Hilfe einer Kristallstruktur des Sirt2/Quercetin-Komplexes aufgeklärt werden. So inhibiert der Naturstoff die Sirtuinaktivität durch Bindung am Eingang des aktiven Zentrums und daraus resultierender Kompetition mit dem acylierten Substrat. In Sirt6 wird diese Bindungsstelle durch den N-Terminus des Proteins besetzt. Die Sirt2-Quercetinbindungsstelle ist in Sirt6 nicht zugänglich. Quercetin bindet stattdessen in einer Sirt6-spezifischen Bindungstasche. Die Sirt2/Quercetin-Struktur trägt dazu bei, den Sirt6-spezifische Aktivierungseffekt von Quercetin zu erklären und liefert somit Informationen zur Weiterentwicklung von Sirt6-spezifischen, potenten Modulatoren. Die Erkenntnisse der Quercetin-Bindung in Sirt2 könnten zudem zur Entwicklung neuer Quercetin-basierender Inhibitoren beitragen.

Neben der Regulation von Sirt6 und Sirt2 steht auch die Aktivierung von Sirt3 im Fokus. Als einziges Sirtuin mit robuster Deacetylaseaktivität im Mitochondrium gilt es als vielversprechendes Ziel zur pharmakologischen Modulation durch Aktivatoren. Aufgrund des Mangels an Sirt3-Aktivatoren wurde durch kristallografisches Screening einer Fragment-Bibliothek nach neuen Modulatoren für Sirt3 gesucht. Auf diese Weise konnten zwei neue Liganden sowie drei bisher unbekannte Liganden-Bindungsstellen für Sirt3 gefunden werden. Aufbauend auf diesen Fragmentgerüsten könnten Kleinmoleküle entwickelt werden, die Potential zur Modulation der Sirt3-Aktivität besitzen.

Das Protein AROS wurde zunächst als bisher einziger endogener Aktivator von Sirt1 beschrieben. Dem widersprechend wurde von anderen Autoren eine inhibierende Wirkung von AROS auf die Sirt1-Deacetylaseaktivität festgestellt. Das Verständnis des Regulationsmechanismus von Sirt1 durch AROS könnte zur Entwicklung pharmakologischer Modulatoren beitragen. In dieser Arbeit konnte das Protein AROS zum ersten Mal charakterisiert werden. AROS akkumuliert exprimiert in *E. coli* in Einschlusskörpern. Daher wurde ein Renaturierungsprotokoll etabliert, welches in löslichem, reinem Protein resultierte. AROS konnte als ein flexibles Protein ohne stabile Tertiärstruktur aber mit Sekundärstrukturelementen wie α -Helices charakterisiert werden. Zudem scheint das Protein unter stabilisierenden Bedingungen eine deutlich strukturiere Konformation einzunehmen.

Der Sirt1/AROS-Komplex musste zunächst durch Optimierung des Puffersystems stabilisiert werden. Anschließend Aktivitätstest von Sirt1 und AROS resultierten in einer Inhibition der Sirt1-Deacetylaseaktivität. Für die Isoformen 2,3 und 5 konnte ebenso eine AROS-vermittelte Inhibition gezeigt werden. Diese ist im Vergleich zu Sirt1 jedoch geringer. Als Interaktionsbereich im Sirtuin konnte der generische, katalytische Sirtuinkern identifiziert werden. Zudem lässt sich die höhere inhibitorische Wirkung von AROS auf Sirt1 durch zusätzliche Interaktionen mit der regulatorischen, N-terminalen Domäne von Sirt1 erklären. Für AROS konnte gezeigt werden, dass der mittlere Bereich des Proteins für die Inhibition verantwortlich ist. N- und C-terminale Abschnitte in AROS scheinen die Affinität zum Sirtuin durch zusätzliche Bindungsstellen zu erhöhen bzw. wichtige Bereiche für die Inhibition zu stabilisieren. Titrationen der beiden Sirt1-Substrate resultierten in einer Verringerung der Affinität des acetylierten Peptid-Substrates in Anwesenheit von AROS und ließen daher auf einen Inhibitions-Mechanismus, der auf Kompetitor mit dem acetylierten Peptid-Substrat beruht, schließen. Eine Kristallstruktur von Sirt3 konnte in Komplex mit einem AROS-Peptid gelöst werden. Im aktiven Zentrum des Sirtuins in der Bindungsstelle des acetylierten Lysins befindet sich das Lysin 65 von AROS, was den Kompetitionsmechanismus bestätigt. Unter Verwendung der strukturellen und mechanistischen Daten wurde ein Modell für den Sirt1/AROS-Komplex postuliert, in dem AROS die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes durch Interaktion mit dem N-Terminus und der katalytischen Domäne von Sirt1 verhindert.

Abstract

Sirtuins are an evolutionary conserved family of class III histone deacetylases. They catalyze the deacetylation of acyllysine residues substrate proteins by a unique mechanism that requires NAD⁺ as cosubstrate, which make sirtuins metabolic sensors. Moreover, they regulate stress responses and aging processes. As they are considered as targets in aging-related and metabolic diseases the regulation of sirtuins is of medical interest and has therapeutic potential. In this thesis, the endogenous regulation of sirtuins by the protein AROS and sirtuin modulation by small molecules were investigated.

In contrast to Sirt6-specific activation, the plant flavonoid quercetin has an inhibitory effect on the other sirtuin isoforms. The molecular basis of the quercetin-mediated inhibition could be elucidated with the help of a crystal structure of the Sirt2/quercetin complex. Thus, the natural compound inhibits sirtuin activity by binding at the entrance of the active site resulting in competition with the acylated substrate. In Sirt6, this binding site is occupied by the N-terminus of the protein and is therefore not accessible. Instead Quercetin binds in a Sirt6-specific binding pocket. The Sirt2/quercetin structure helps to explain the Sirt6-specific activation effect of quercetin and thus provides information for further development of Sirt6-specific potent modulators. The findings of quercetin binding in Sirt2 could also contribute to the development of new quercetin-based inhibitors.

In addition to the modulation of Sirt6 and Sirt2 the activation of Sirt3 is also in focus. As the only mitochondrial sirtuin with robust deacetylase activity it is considered as a promising target for pharmacological modulation by activators. Due to the lack of Sirt3 activators, new modulators for Sirt3 were screened by crystallography with a fragment library. As a result two new ligands and three unknown ligand-binding sites for Sirt3 were found. Based on these fragment scaffolds small molecules with potential to modulate Sirt3 activity could be developed.

The protein AROS was initially described as the only endogenous activator of Sirt1 to date. Contrary to this other authors found an inhibitory effect of AROS on Sirt1 deacetylase activity. Understanding the regulatory mechanism of Sirt1 by AROS could contribute to the development of pharmacological modulators. In this work, the protein AROS was characterized for the first time. AROS accumulates in inclusion bodies in

E. coli. Therefore, a renaturation protocol was established, resulting in soluble, pure protein. AROS could be characterized as a flexible protein without a stable tertiary structure but with secondary structural elements such as α -helices. In addition, the protein appears to adopt a much more structured conformation under stabilizing conditions.

The Sirt1/AROS complex needed to be stabilized. This was done by optimizing the buffer system. Subsequent activity assays of Sirt1 and AROS resulted in an inhibition of Sirt1 deacetylase activity. For the isoforms 2,3 and 5, an AROS-mediated inhibition was shown, albeit with varying potency. The generic, catalytic sirtuin core was identified as the interaction region in the sirtuin. Furthermore, the higher inhibitory effect of AROS on Sirt1 can be explained by additional interactions with the regulatory N-terminal domain of Sirt1. For AROS, it was shown that the middle region of the protein is responsible for inhibition. N- and C-terminal extensions in AROS seem to increase the affinity to the sirtuin by additional binding sites or to stabilize important regions for inhibition. Titrations of the two Sirt1 substrates resulted in a decrease in the affinity of the acetylated peptide substrate in the presence of AROS, suggesting an inhibitory mechanism based on competition with the acetylated peptide substrate. A crystal structure of Sirt3 could be solved in complex with an AROS peptide. The active site of the sirtuin in the binding site of the acetylated lysine contains the lysine 65 of AROS, confirming the mechanism of competition. Using the structural and mechanistic data, a model for the Sirt1/AROS complex was postulated in which AROS prevents the formation of an enzyme-substrate complex by interacting with the N-terminus and catalytic domain of Sirt1.

1 Einleitung

1.1 Reversible Proteinacetylierung

Das humane Genom umfasst laut dem *Human Proteome Project* (HPP) 19.823 Gene (Stand März 2021), welche für Proteine kodieren. Das humane Proteom übertrifft diese Zahl um mehrerer Größenordnungen^{1,2}. Die Ursache dafür sind zwei Mechanismen: Der eine Mechanismus ist das mRNA-*splicing*^{3,4}. Der andere Mechanismus ist die posttranslationale Modifikation (PTM). Hierbei werden Proteine durch spezifische enzymkatalysierte Reaktionen an den Seitenketten der Aminosäuren kovalent modifiziert oder am Proteinrückgrat durch Proteasen bzw. autokatalytisch geschnitten. Der menschliche Organismus besitzt dafür 500 Proteinkinasen, 150 Phosphatasen, 500 Proteasen und weitere Enzyme. Die wichtigsten PTMs sind Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Glykosylierung und Ubiquitinierung.

Die reversible Phosphorylierung von Proteinen, welche in den 1950er-Jahren von Edmond Fischer und Edwin Krebs entdeckt wurde, ist die wohl am besten untersuchte PTM^{5,6}. Durch Hinzufügen oder Entfernen von kovalent gebundenen Phosphat-Gruppen an einzelnen Aminosäuren wechseln die Proteine zwischen aktiven und inaktiven Formen. Auf diese Weise werden Prozesse, die den Stoffwechsel, den Membrantransport, die Transkription oder den zellulären Transport beeinflussen, reguliert⁷. Der Stellenwert der Phosphorylierung zur Regulation der Zellfunktion ist seit langer Zeit bekannt. Im Gegensatz zur Acetylierung, deren zentrale Rolle als PTM erst in den letzten Jahren an Bedeutung gewinnt⁸.

Die reversible Acetylierung der N ϵ -Aminogruppe von Lysinen wurde erstmals an Histonproteinen in Chromatin von Allfrey *et al.* im Jahr 1964 entdeckt⁹. Als Chromatinmodifikation ist die Acetylierung ein seit langem bekannter epigenetischer Marker und Regulationsmechanismus. Sie beeinflusst verschiedenste Funktionen, wie zum Beispiel die Transkription und die Chromatinkondensation zur Zellteilung¹⁰. Obwohl die Acetylierung nur wenige Jahre nach der Phosphorylierung entdeckt wurde, waren Histone lange Zeit die einzigen bekannten Substrate. Erst in den vergangenen Jahren wurden neben den Histonproteinen weitere Proteine mit Acetylierungsstellen gefunden. Mittels MS-Techniken konnten mehr als 6800 Proteinacetylierungen im Säugetierproteom identifiziert werden. Diese umfassen zelluläre Proteine aller Klassen

wie Strukturproteine, Enzyme und Signalproteine^{11–13}. Es konnte gezeigt werden, dass die reversible Acetylierung den Stoffwechsel, die Hirnfunktion sowie das kardiovaskuläre System beeinflusst^{14–16}. Somit handelt es sich bei der reversiblen Acetylierung ebenso wie bei der reversiblen Phosphorylierung um einen universellen Regulationsmechanismus⁸.

Acetylierungen können sowohl enzymatisch durch Lysin-Acetyltransferasen (KAT), als auch nicht-enzymatisch erfolgen¹⁷. Enzyme, die Acetylierungen entfernen, heißen aus historischen Gründen Histon-Deacetylasen (HDAC). Heutzutage werden sie auch als Lysin-Deacetylasen (KDAC) bezeichnet.

1.2 Sirtuine NAD⁺-abhängige Deacylasen

KDACs werden basierend auf Sequenzähnlichkeit in vier Klassen unterteilt. Die Klassen I, II und IV sind Hydrolasen mit einem katalytischen Zn²⁺-Ion¹⁸. Die dritte Klasse sind die Sirtuine. Sie unterscheiden sich von den anderen hinsichtlich ihrer Struktur und ihres katalytischen Mechanismus. Sirtuine katalysieren einen einzigartigen Mechanismus, welcher NAD⁺ als essenzielles Cosubstrat benötigt. Dies macht sie zu metabolischen Sensoren¹⁹.

Die Bezeichnung „Sirtuine“ leitet sich von dem Protein „*silent information regulator two*“ (Sir2) aus *Saccharomyces cerevisiae* ab. Es handelt sich um das Gründungsmitglied dieser Proteinfamilie. Sir2 sorgt für die Stilllegung bestimmter Chromatinbereiche, einschließlich der Abschnitte der rDNA, der Telomere sowie der Gene für die *mating type loci HML/HMR*²⁰. Die Überexpression von SIR2 in Hefe zeigt im Vergleich zum Wildtyp einen signifikanten lebensverlängernden Effekt und ist somit eine wichtige Komponente für den Alterungsprozess in Hefe²¹. Da Sirtuine zwischen Eukaryoten, Prokaryoten und Archaeen hoch konserviert sind, wurden weitere Anstrengungen unternommen, um den Einfluss auf Alterungsprozesse auch in höheren Organismen zu untersuchen²².

1.2.1 Isoformen, Lokalisation und Funktion der Säugetiersirtuine

Säugetiere besitzen sieben Isoformen (Sirt1-7), die sich in der zellulären Lokalisation, der Substratspezifität und dem Aufbau unterscheiden (Abbildung 1A). Sirt1, das Säugetierhomolog mit der höchsten Sequenzidentität zu dem Hefesirtuin Sir2, ist ebenso wie Sirt6 und 7 im Nukleus lokalisiert²³.

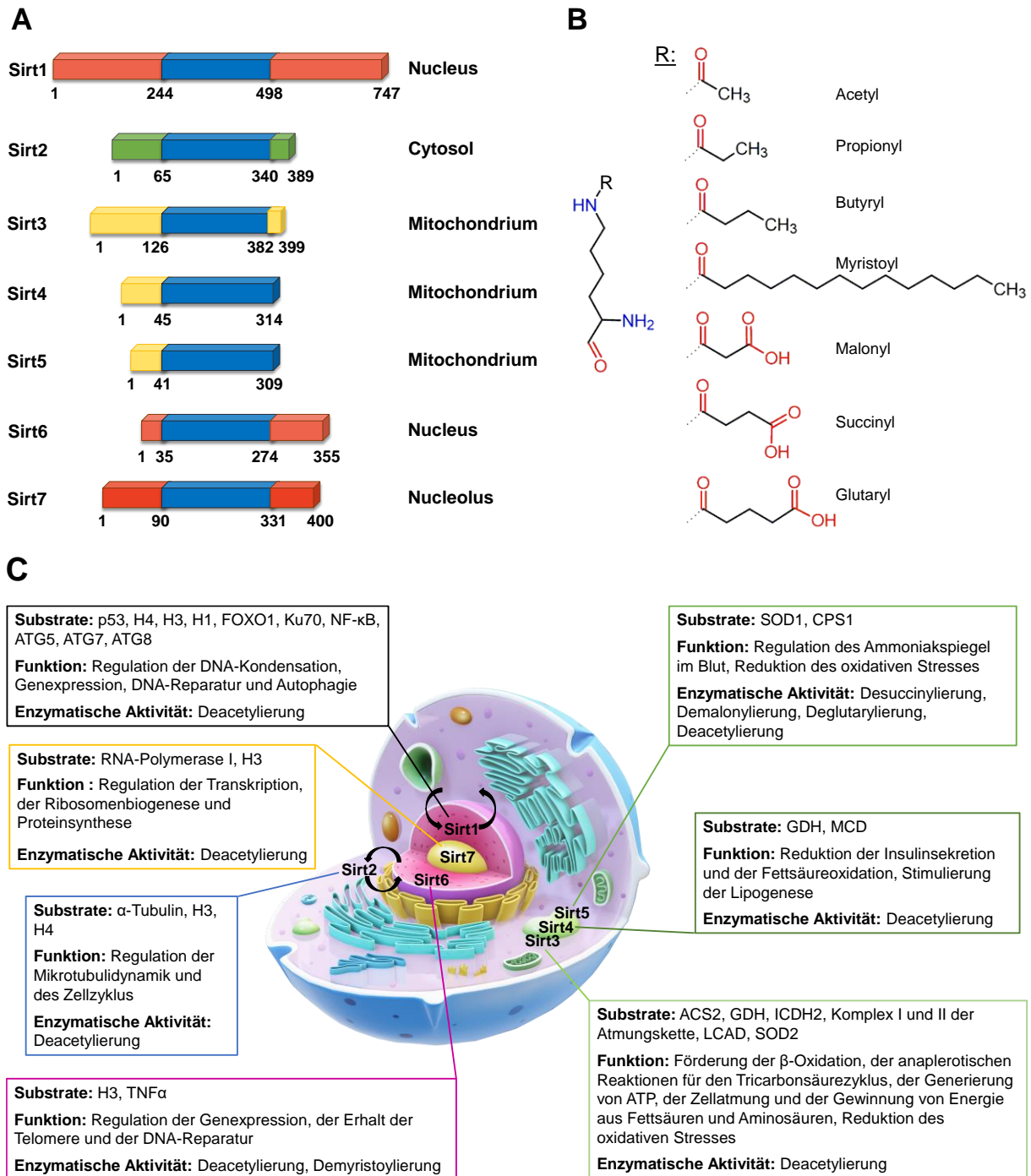


Abbildung 1 Isoformen der Säugetiersirtuine und deren zelluläre Lokalisation, enzymatischen Aktivitäten, Substrate und Funktionen. (A) Die sieben Isoformen der Sirtuine besitzen einen hochkonservierten katalytischen Kern, der von N- und C-terminalen Verlängerungen flankiert wird, die sich in Länge und Sequenz unterscheiden. Die Flankierungen enthalten Domänen zur Regulation der enzymatischen Aktivität sowie zur Stabilisierung und sind für die Lokalisierung der Isoformen verantwortlich (B) Die Isoformen haben unterschiedliche Deacylaseaktivitäten. Bei einigen handelt es sich um robuste Deacetylase. Dahingegen bevorzugen andere langkettige Fettsäuren oder geladene Acyl-Gruppen. (C) Sirtuine spielen eine Rolle in diversen Prozessen. Sie besitzen zahlreiche Substrate und Funktionen in den verschiedenen Zellkompartimenten.

Sirt2 kann sich unter bestimmten Stressbedingungen ebenfalls im Kern akkumulieren, ist aber hauptsächlich im Cytosol vorzufinden²⁴. Sirt3-5 sind die mitochondrialen Isoformen²⁵. Die am besten untersuchte Isoform ist Sirt1. Zahlreiche nukleare Substrate für Sirt1 sind bekannt. Dazu gehören die Histone H4, H3, und H1, die Transkriptionsfaktoren p53 und *forkhead box protein O1* (FOXO1) sowie Proteine zur DNA-Reparatur, wie z.B. Ku70. Durch Deacetylierung dieser Substrate reguliert Sirt1 die Kondensation der DNA, die Genexpression und die DNA-Reparatur^{26–28}. Des Weiteren kann Sirt1 in das Cytosol transportiert werden²⁹ und dort Autophagie regulieren, indem es autophagieassoziierte Proteine deacetyliert¹⁴.

Die anderen nuklearen Isoformen Sirt6 und 7 sind weniger gut untersucht. Sirt6 assoziiert mit dem Chromatin und beeinflusst die Funktion von Histonen, Transkriptionsfaktoren und Proteinen zur DNA-Reparatur. Somit reguliert es Prozesse wie die Genexpression, den Erhalt der Telomere und die DNA-Reparatur. Das bekannteste Substrat von Sirt6 ist das Histon H3³⁰. Anhand von Peptiden, die auf dem Sirt6 Substrat Histon H3 beruhten, konnte gezeigt werden, dass Sirt6 eine höhere Aktivität gegenüber langkettigen Lysin-Acylierungen wie Myristoylierungen zeigt³¹. Auch Sirt5 bevorzugt andere Acylgruppe als das Acetyl. Bei dieser Isoform handelt es sich um eine Desuccinylase, Demalonylase und Deglutarylase^{32–34} (Abbildung 1B). Folglich sind Sirtuine nicht nur Deacetylasen sondern Deacylasen.

Sirt7 ist die einzige Isoform, von der bekannt ist, dass sie im Nucleolus vorkommt. Die Funktion der RNA-Polymerase I und des Histons H3 wird von Sirt7 beeinflusst. Es reguliert die Transkription sowie die Ribosomenbiogenese und Proteinsynthese^{35,36}.

Die mitochondrialen Isoformen Sirt3-5 beeinflussen den Stoffwechsel und die Apoptose³⁷. Sirt3 reguliert dabei die mitochondriale Lysinacetylierung zahlreicher Substrate. Dazu zählen die Acetyl-CoenzymA-Synthetase 2 (ACS2), die Glutamatdehydrogenase (GDH), die Isocitrat Dehydrogenase ICDH2, der Komplex I und II der Atmungskette sowie die Acyl-CoenzymA-Dehydrogenase LCAD. Durch Deacetylierung und damit Aktivierung dieser Enzyme fördert Sirt3 die β -Oxidation, anaplerotische Reaktionen für den Tricarbonsäurezyklus, die Generierung von ATP sowie die Zellatmung und steigert die Gewinnung von Energie aus Fettsäuren und Aminosäuren^{25,38–40}. Des Weiteren reduziert Sirt3 oxidativen Stress. Durch Aktivierung der Superoxid-Dismutase 2 (SOD2) wird das Vorhandensein von reaktiven

Sauerstoffradikalen (ROS) vermindert⁴¹. Ebenso wie Sirt3 reduziert auch Sirt5 die Konzentration von ROS. Dazu aktiviert es das Enzym SOD1⁴². Die Deacylase Sirt5 reguliert außerdem den Ammoniakspiegel im Blut, indem es die Carbamoylphosphat-Synthetase I (CPS1), welche den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Harnstoffzyklus katalysiert, aktiviert⁴³. Über die Funktion von Sirt4 ist weniger bekannt. Es inhibiert die GDH und wirkt somit der Aktivierung durch Sirt3 entgegen. Dadurch wird die Insulinsekretion reduziert⁴⁴. Des Weiteren deacetyliert es die Malonyl-Coenzym A-Decarboxylase (MCD). MCD katalysiert die Umsetzung von Malonyl-Coenzym A zu Acetyl-Coenzym A. Die Inhibierung dieser Reaktion durch Sirt4 führt zu einer Verminderung der Fettsäureoxidation und einer Stimulierung der Lipogenese⁴⁵.

Die cytosolische Isoform Sirt2 deacetyliert α -Tubulin und reguliert dadurch die Dynamik der Mikrotubuli⁴⁶. Hinzu kommt, dass Sirt2 während der G2/M-Phase des Zellzyklus vorübergehend in den Nukleus transportiert werden kann. Indem es die Histone H3 und H4 deacetyliert, ist Sirt2 an der Regulation des Zellzyklus beteiligt^{14,47}.

1.2.2 Struktureller Aufbau der Sirtuine

Sirtuine besitzen einen hochkonservierten katalytischen Kern bestehend aus ca. 270 Aminosäuren. Flankiert wird dieser von N- und C-terminalen Verlängerungen, die sich je nach Isoform in Sequenz und Länge unterscheiden⁴⁸. Es handelt sich hierbei um Abschnitte, die Kernlokalisierungssignale (NLS) bzw. Signalsequenzen zur mitochondrialen Lokalisation (MLS) enthalten und um Domänen zur Regulation der enzymatischen Aktivität sowie zur Stabilisierung^{49–51}. Der katalytische Kern besteht aus einer großen NAD⁺-bindenden Domäne, welche eine Rossmannfaltung besitzt, und einer kleinen zinkbindenden Domäne^{52,53}. Die Rossmannfaltung setzt sich aus einem zentralen sechssträngigen, parallelen β -Faltblatt zusammen und ist von mehreren α -Helices umgeben. Die große Domäne der Sirtuine zeigt die typischen Merkmale einer NAD-Bindungsstelle. Sie besitzt eine konservierte Gly-X-Gly Sequenz, die essenziell für die Bindung des Phosphates ist und eine Tasche zur Aufnahme des NAD-Moleküls⁵². Die Zink-bindende Domäne der Sirtuine ist im Gegensatz zu den anderen KDAC-Klassen I, II und IV nicht an der Katalyse beteiligt, sondern dient der Stabilität der Struktur. Sie besteht aus einem dreisträngigen antiparallelen β -Faltblatt und einem α -helikalem Bereich. In dieser Domäne unterscheiden sich die

Sirtuinisoformen am meisten. Das Zinkion bindet an die Sulfhydrylgruppe von vier hochkonservierten Cysteinen, welche sich in dem antiparallelen Faltblatt befinden^{52,54}.

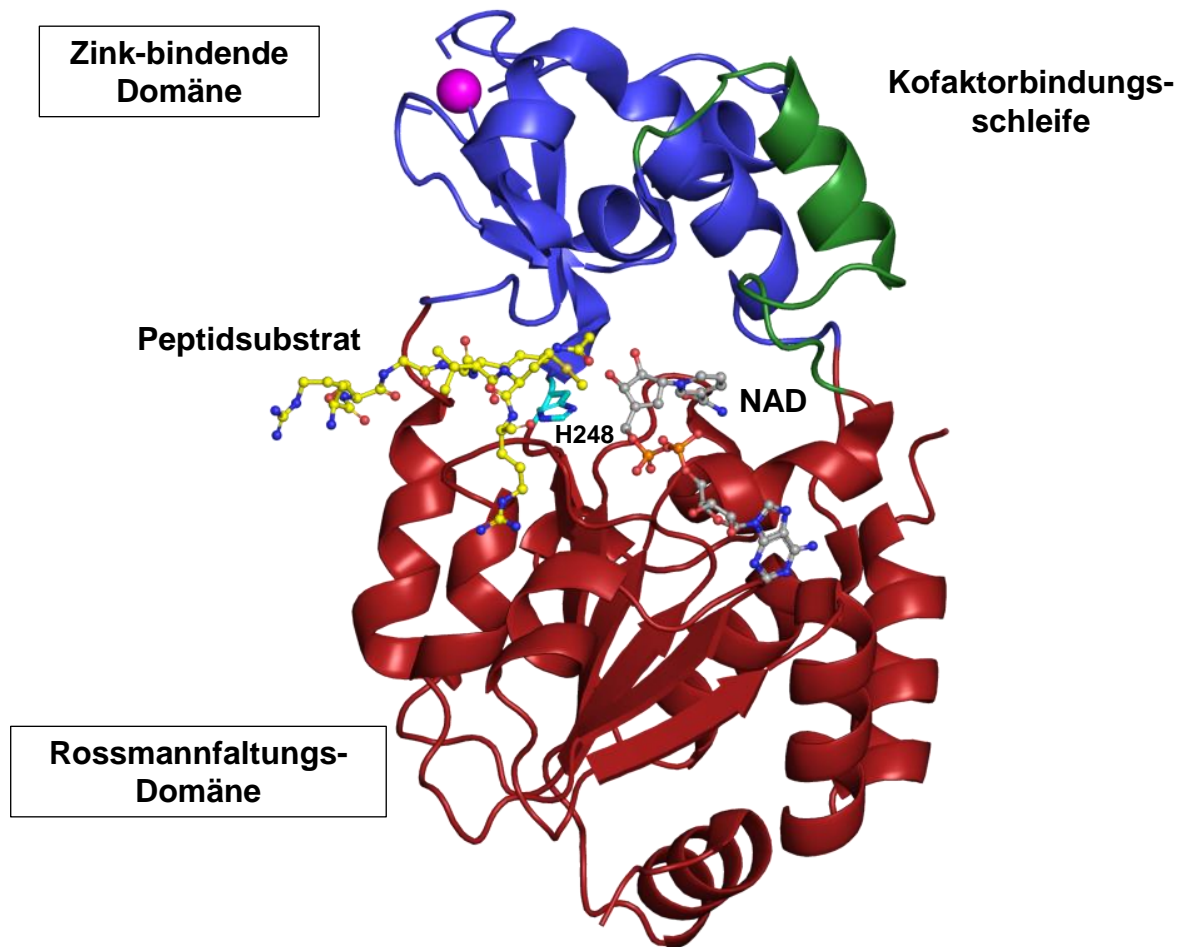


Abbildung 2 Struktur der konservierten, katalytischen Domäne von Sirtuinen. Als Beispiel für die konservierte katalytische Domäne der Sirtuine ist die Kristallstruktur von Sirt3 (3GLU)⁵⁵ in der Cartoon-Darstellung abgebildet. Die katalytische Domäne setzt sich aus der Rossmannfaltungs-Domäne (rot) und der kleineren Zink-bindenden Domäne (Blau) mit dem gebundenen Zink (Magenta) zusammen. Diese sind über eine Kofaktor-Bindungsschleife (Grün) miteinander verbunden. Das aktive Zentrum mit dem katalytischen Histidin H248 (Cyan), der Bindungsstelle für das acetylierte Substrat ACS2 (Gelb) und dem gebundenen NAD⁺ (Grau) befindet sich in einer Spalte zwischen den Domänen. Die Elemente Stickstoff, Sauerstoff und Phosphor sind blau, rot bzw. orange. Das katalytische Histidin sowie das Substratpeptid und NAD⁺ sind als Stäbchen dargestellt. Das NAD⁺-Molekül von 1SZC⁵⁶ diente als Vorlage für die Darstellung in 3GLR.

Das aktive Zentrum der Sirtuine befindet sich in einer Spalte zwischen der großen und der kleinen Domäne und wird von vier Schleifen gebildet. Die Form sowie die Polarität der Spalte unterscheiden sich je nach Isoform. Die Aminosäurereste, welche das

acylierte Lysin im Substratprotein umgeben, sind daher wichtig für die Substratspezifität der Isoformen⁵⁷. Die Schleife, die Teil der NAD⁺-Bindestelle ist, wird auch als Kofaktorbindungsschleife (*cofactor binding loop*) bezeichnet. Einige wenige Aminosäuren der Kofaktorbindungsschleife bilden die C-Tasche. Diese Region nimmt den Nicotinamid-Anteil von NAD⁺ auf. Die Bindung der Substrate führt zu einer konformationellen Änderung, bei der sich beide Domänen räumlich annähern und eine geschlossene Konformation annehmen. Die Kofaktorbindungsschleife, welche zuvor sehr flexibel war, wird strukturiert. Dies zeigt die konformationelle Dynamik der Sirtuine⁵².

1.2.3 Katalytischer Mechanismus und Deacylaseaktivitäten der Sirtuine

Sirtuine katalysieren die Reaktion von NAD⁺ und einem acylierten Lysin zu Nicotinamid, deacyliertem Lysin und 2'-O-Acyl-ADP-Ribose (OAADPr). Biochemische Daten und verschiedene Kristallstrukturen weisen darauf hin, dass es sich bei dem Sirtuinmechanismus um eine zweistufige Reaktion handelt, bei der es zu einer Bildung eines Intermediats kommt.

Im ersten Schritt der Reaktion findet eine nukleophile Addition des Acetylsauerstoffs zum C1 Kohlenstoff der Nicotinamidribose statt. Dabei wird Nicotinamid freigesetzt und es bildet sich das Intermediat C1'-O-Alkylamidat. Im nächsten Schritt wird ein Proton der 3'-Hydroxylgruppe der NAD⁺-Ribose von einem in allen Sirtuinen hochkonservierten Histidin abstrahiert. Daraufhin wird die 2'-Hydroxylgruppe der NAD⁺-Ribose deprotoniert und das aktivierte Hydroxyl greift den Kohlenstoff des O-Alkylamidats an. Es bildet sich ein bicyclisches 1'-2'-Acetal Intermediat. Es folgt eine Hydrolyse des Intermediats, und das deacylierte Proteinsubstrat sowie die 2'-O-Acyl-ADP-Ribose werden freigesetzt^{19,58}.

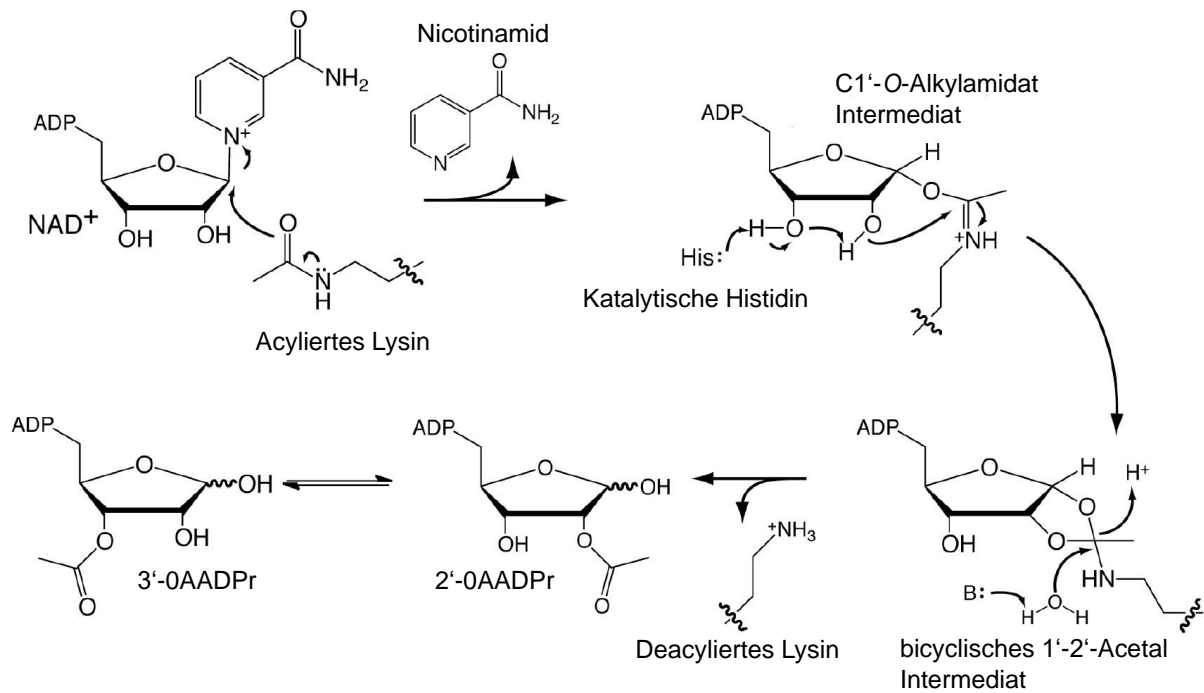


Abbildung 3 Reaktionsmechanismus der Sirtuine. Die NAD⁺-abhängige Lysin-Deacetylierung katalysiert durch Sirtuine erfolgt in zwei Schritten. Im ersten Schritt wird das Produkt Nicotinamid frei und es bildet sich das Zwischenprodukt C1'-O-Alkylamidat. Im darauffolgenden Schritt entsteht das deacetylierte Lysin und das Produkt 2'-OAAADPr (2'-O-Acyl-ADP-ribose)⁵⁸.

Die Isoformen Sirt1, 2 und 3 haben eine robuste Deacetylase-Aktivität. Des Weiteren konnte für Sirt6 gezeigt werden, dass es ganze Nukleosomen deacetyliert⁵⁹. *In vitro* hingegen ist die Deacetylase-Aktivität von Sirt6 für freie Histone und Peptide gering. Ebenso konnten für die Isoformen Sirt4/5 und 7 *in vitro* nur geringe bzw. keine Deacetylase-Aktivität nachgewiesen werden. Für Sirt4 und Sirt6 wurde zunächst von einer ADP-Ribosyltransferase-Aktivität ausgegangen^{60,61}. Aktivitätstests hingegen ergaben, dass es sich lediglich um eine ineffiziente Nebenreaktion handelt⁶². Biochemische Analysen sowie zahlreiche Kristallstrukturen der Sirtuine mit verschiedenen Substratpeptiden erklären die unterschiedlichen Deacetylaseaktivitäten. So hat Sirt6 eine höhere Aktivität gegenüber langkettigen Acylierungen wie Myristoylierungen. Die Kristallstruktur von Sirt6 mit einem myristoylierten Peptid des Histons H3 zeigt, dass das Sirtuin einen großen hydrophoben Tunnel besitzt, indem langkettige Acyl-Lysin-Substrate binden können (Abbildung 4A)³¹. Bestimmte Fettsäuren können in diesem hydrophoben Tunnel binden und dabei die Affinität des acetylierten Substrates erhöhen. Als Resultat kann die Deacetylaseaktivität signifikant gesteigert werden⁶³.

Im Vergleich zu Sirt6 befindet sich im aktiven Zentrum von Sirt3 ein Phenylalanin (F180), welches die Bindung von langkettigen Acylierungen oder Carbonsäure-Acylierungen sterisch verhindert. Daraus resultiert die robuste Deacetylaseaktivität von Sirt3 (Abbildung 4B)⁵⁵.

Sirt5 hingegen besitzt in diesem Bereich ein kurzes Alanin. Zudem befindet sich in der Acyl-Bindungsstelle ein Tyr-X-X-Arg Motiv, mit dem negativ geladene Acylierungen koordiniert werden können (Abbildung 4C). Dies erklärt die Spezifität der Isoform für längere, geladene Acyl-Modifikationen. Dementsprechend zeigt Sirt5 einen effizienten Umsatz von Carbonsäure-Acylierungen, wie z.B. Malonyl-, Succinyl- und Glutaryl-Lysine⁶⁴.

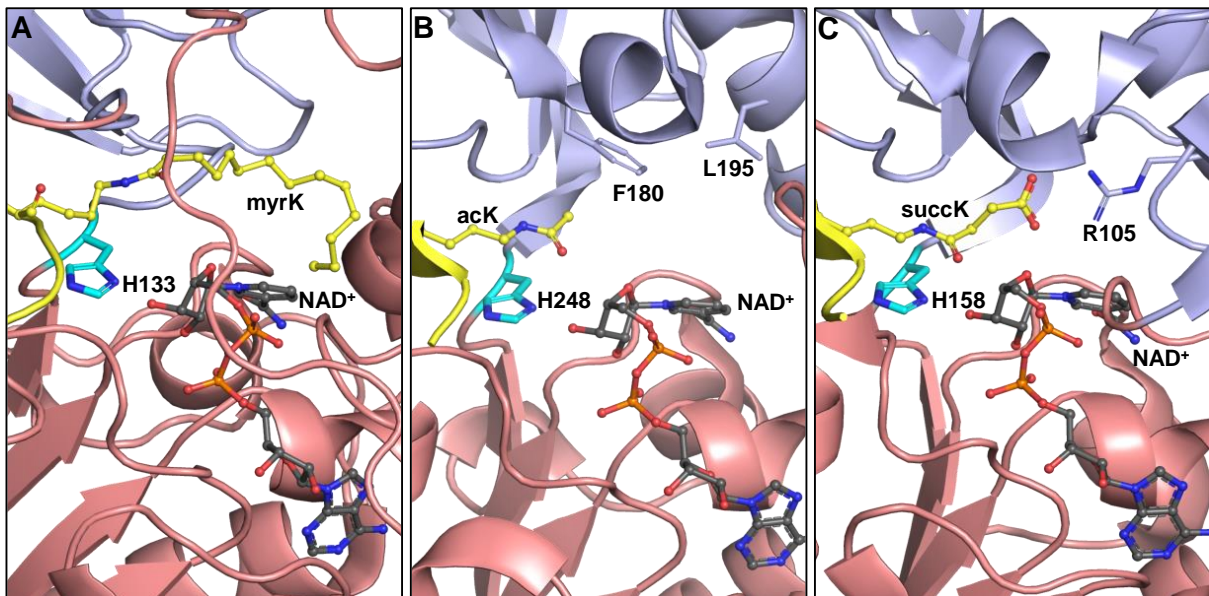


Abbildung 4 Die katalytischen Zentren der Sirtuinisoformen sind für die Bindung unterschiedlicher Acyl-Modifikationen optimiert. (A) Aufgrund der großen hydrophoben Tasche im aktiven Zentrum von Sirt6 können langkettige Acyl-Modifikationen (z.B. Myristoylierungen, myrK). (B) In Sirt3 ist die Bindungsstelle für Acyl-Lysine durch ein Phenylalanin (F180) begrenzt, sodass nur kurze Acyl-Modifikationen (acK) gebunden werden können. (C) Die Acyl-Lysin-Bindungsstelle in Sirt5 ist größer und ein Arginin (R105) koordiniert die negativ-geladene Carboxyl-Gruppe des succinylierten Substrates (succK). Abgebildet sind die PDB Einträge von hSirt3 (3GLR)⁵⁵, hSirt5 (3RIY)⁶⁴ und hSirt6 (3ZG6)³¹ in Cartoon-Optik. Die Zink-bindende Domäne ist in Hellblau, die Rossmannfaltungs-Domäne in Hellrot, das katalytische Histidin in Cyan, NAD⁺ in Grau und das acylierte Peptidsubstrat in Gelb dargestellt. Die Elemente Stickstoff, Sauerstoff und Phosphor sind blau, rot bzw. orange. Für die Seitenketten der Aminosäuren im aktiven Zentrum sowie des acylierten Lysin und NAD⁺ wurde die Darstellung als Stäbchen und Kugeln verwendet. Das NAD⁺-Molekül von 3RIY diente als Vorlage für die Darstellung in 3GLR und 3ZG6.

1.3 Regulation von Sirtuinen

Sirtuine sind zentrale Regulatoren diverser Schlüsselfunktionen im Körper und müssen daher streng reguliert werden^{14,65}. Dies erfolgt auf Ebene der Genexpression, durch PTMs und durch Interaktion mit anderen Proteinen oder physiologischen Kleinmolekülen. Des Weiteren können Sirtuine mit pharmakologischen Kleinmoleküle aktiviert bzw. inhibiert werden.

An dieser Regulation beteiligt sind die N- bzw. C-terminalen Verlängerungen. Diese ist bisher nur teilweise verstanden. Im Falle von Sirt1 gibt es C-terminal eine Region, welche sich als β -Haarnadel strukturiert und Teil der Rossmannfaltung ist. Diese Sequenz, bestehend aus ca. 25 Aminosäuren, ist für die Aktivität von Sirt1 essentiell und wird als ESA-Region (*essential for Sirt1 activity*) bezeichnet⁶⁶. N-terminal befindet sich eine Region, die aus einem Bündel von drei α -Helices besteht. Da es sich hierbei um eine allosterische Bindungsstelle für Aktivatoren handelt, wird die Domäne auch als *STAC-binding domain* (SBD) bezeichnet (Abbildung 5)⁶⁷.

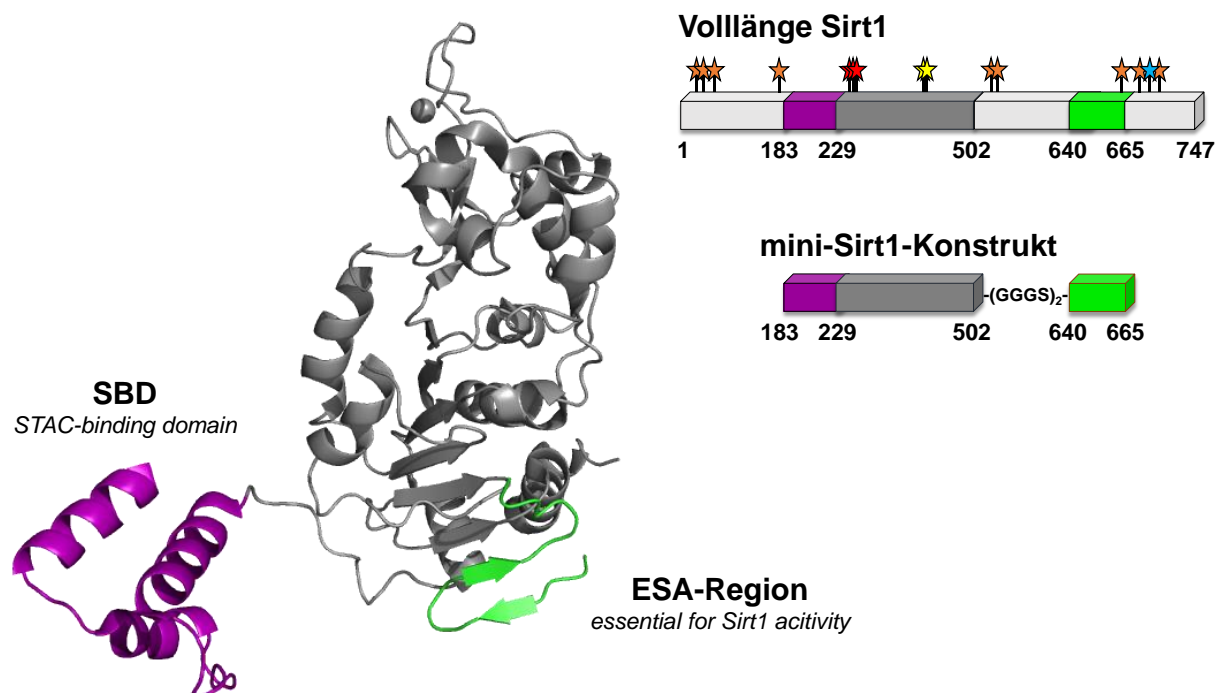


Abbildung 5 Regulatorische Regionen von Sirt1. Eine Kristallstruktur (4zzh)⁶⁸ eines verkürzten mini-Sirt1-Konstruktes zeigt die katalytische Domäne (grau) sowie die zwei regulatorischen Bereiche SBD (magenta) und ESA-Region (grün) in Cartoon-Darstellung. Positionen der PTMs Phosphorylierung (Orange), Methylierung (Rot), Nitrosylation (Gelb) und Sumoylierung (Blau) sind als Stern markiert.

Die Expression von Sirtuinen kann durch diverse Transkriptionsfaktoren erhöht oder unterdrückt werden. So konnte gezeigt werden, dass das Sirt1 Substrat FOXO1 an den Promotor von Sirt1 bindet und zu einer Erhöhung der Expression führt⁶⁹. Der Regulator *hypermethylated in cancer 1* (HIC) hingegen bildet mit Sirt1 ein Repressorkomplex, der an den Sirt1-Promotor bindet und die Expression unterdrückt⁷⁰.

Es sind eine Vielzahl an PTMs für alle Isoformen bekannt. Diese umfassen Acetylierungen, Phosphorylierungen, Methylierungen, Sumoylierung, Ubiquitinierung, Carbonylierung und Nitrosylierung^{71–73}. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die N- und C-terminalen Verlängerungen der Sirtuine Ziele für PTMs sind und diese einen Einfluss auf die Aktivität der Sirtuine haben^{71,74}. Zum Beispiel phosphoryliert die Kinase *c-Jun N-terminal kinase 1* (JNK1) infolge von oxidativem Stress die Aminosäuren Ser27, Ser47 und Thr530 von Sirt1. Dies führt zu einer erhöhten Lokalisierung von Sirt1 im Zellkern und zu einer zunehmenden Deacetylierung des Histonsubstrates H3⁷⁵. Die *mammalian target of rapamycin* (mTOR) abhängige Phosphorylierung der Aminosäure Ser47 von Sirt1 resultiert hingegen in eine Inhibierung der Sirt1-Aktivität⁷⁶.

1.3.1 Regulation durch physiologische Kleinmoleküle

Alle Sirtuinisoformen haben die Abhängigkeit von ihrem Cosubstrat NAD⁺ gemeinsam. NAD⁺ ist ein Indikator des metabolischen Zustandes der Zelle. Die Konzentration an NAD⁺ wird von dessen Biosynthese und Rückgewinnungsprozessen beeinflusst⁷⁷. Unter physiologischen Bedingungen wird NAD⁺ schnell zu NADH reduziert. Die Konzentration von NAD⁺ steigt in Muskeln, Leber und weißen Fettgewebe durch Kalorienrestriktion und Sport. Dies hat eine erhöhte Sirtuinaktivität zur Folge^{78,79}. Interessanterweise führt eine Erhöhung der NAD⁺-Biosynthese in Hefe zu einer deutlichen Verlängerung der Lebensspanne⁸⁰. Sirtuine scheinen als Ursache für eine verbesserte Gesundheit in Folge von Kalorienrestriktion und Sport verantwortlich zu sein. Das Ausschalten von Sirtuinen oder der NAD⁺-Rückgewinnung in einfachen Organismen führte trotz Kalorienrestriktion nicht zu einer Verlängerung der Lebensspanne^{81,82}. Dahingegen lebten die Organismen bei Überexpression der Sirtuine länger⁸³.

Im Gegensatz zur Kalorienrestriktion und den damit einhergehenden positiven Effekten auf Gesundheit und Lebensspanne, sinkt das Verhältnis von NAD⁺ zu NADH

infolge einer fettreichen Ernährung⁸⁴. Niedrigere NAD⁺-Konzentration haben eine geringere Sirtuinaktivität zur Folge. Hinzu kommt, dass es sich bei NADH um einen schwachen kompetitiven Inhibitor handelt⁸⁵.

Ein anderer Metabolit, der die Aktivität von Sirtuinen beeinflusst, ist Nicotinamid. Als Produkt des ersten Reaktionschrittes in der Katalyse ist es in der Lage, wieder an den Sirtuin/Intermediat-Komplex zu binden. Dadurch wird der erste Schritt der Reaktion umgekehrt und das Cosubstrat NAD⁺ wird gebildet. Auf diese Weise wird die Deacylaseaktivität inhibiert. Nicotinamid ist ein nichtkompetitiver Inhibitor^{86,87}, der je nach Sirtuinisoform einen K_i-Wert zwischen 50 µM und 200 µM besitzt^{87–89}. Physiologische Konzentrationen von Nicotinamid schwanken zwischen 11 µM und 400 µM. Eine regulatorische Funktion von Nicotinamid konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden. Daher handelt es sich bei Nicotinamid um einen zellulären Regulator von Sirtuinen^{80,87}.

1.3.2 Regulation durch pharmakologische Kleinmoleküle

Die Regulation von Sirtuinen gilt als vielversprechender Ansatz zur Behandlung von Stoffwechselerkrankungen sowie altersbedingter Erkrankungen. Daher gab es in den letzten Jahren zahlreiche Bemühungen zur Erforschung von Molekülen, welche die Sirtuinaktivität beeinflussen. Hierbei sind sowohl Aktivatoren als auch Inhibitoren von großen Interesse⁹⁰. Aufgrund der zahlreichen positiven Effekte der Sirtuine, könnte eine gezielte Aktivierung ein vielversprechender Ansatzpunkt sein, um altersbedingte Erkrankungen vorzubeugen und die Lebensspanne zu verlängern⁹¹. Hingegen könnte zum Beispiel der Einsatz von Inhibitoren für Sirt2 zur Behandlung von Krebs oder neurodegenerativer Krankheiten wie die Parkinson-Krankheit interessant sein^{92–94}.

Pharmakologische Kleinmolekülen unterbinden oftmals den katalytischen Mechanismus von Enzymen. Im Gegensatz dazu erfolgt bei Aktivatoren meist eine konformationelle Änderung infolge einer allosterischen Bindung, welche dann ein bereits evolutionär optimiertes System verbessern muss. Aktivatoren haben den Vorteil, dass deren allosterische Bindungstaschen mit geringerer Wahrscheinlichkeit ebenso stark konserviert sind, wie das aktive Zentrum. So zeigen Sirtuine die höchste Konservierung in der katalytischen Domäne und unterscheiden sich am meisten in den N- und C-terminalen Verlängerungen. Die allosterische Aktivierung bietet daher die

Möglichkeit die Spezifität der Verbindungen zu erhöhen und dadurch unerwünschte Nebeneffekte zu reduzieren⁹⁵.

Der erste *Sirtuin activating compound* (STAC), welcher für Sirtuine beschrieben wurde, ist Resveratrol. Hierbei handelt es sich um einen in Rotwein vorkommenden Polyphenol. Es konnte gezeigt werden, dass Resveratrol Sirtuine der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* aktiviert und dadurch in der Lage ist, eine Kalorienrestriktion nachzuahmen, welche zu einer Verlängerung der Lebensspanne führt^{96,97}. Die Sirtuinaktivierung durch Resveratrol wird kontrovers diskutiert, da die Verbindung mit dem fluorophorbasierten Peptidsubstrat des *in vitro* Assays interagiert. Hierbei handelt es sich um das „Fluor-de-Lys“-Substrat, bei dem sich C-terminal des Acetyllysins ein nicht physiologischer Fluorophor befindet⁹⁸. Eine andere Studie konnte jedoch auch in einem Microarray System mit 6802 physiologischen Acetylierungsstellen des Säugetieracetyloms einen resveratrolabhängigen Effekt auf Sirt1 zeigen. Je nach Substratsequenz wurde eine Inhibierung, eine Aktivierung bzw. kein Effekt durch Resveratrol nachgewiesen. Daher lässt sich vermuten, dass der Einfluss auf die Sirt1-Aktivität durch Resveratrol abhängig vom Substrat ist⁹⁹. Die kristallografische Charakterisierung von Sirt1 mit Resveratrol haben gezeigt, dass das Kleinmolekül mit der allosterischen Bindungsstelle SBD interagiert. Die Bindung von Resveratrol an die SBD führt zu einer stärkeren Bindung zwischen Sirt1 und dem Substratpeptid und dadurch zur Stimulation der Sirtuinaktivität¹⁰⁰. Dieser postulierte Mechanismus wird durch Daten, welche eine Erniedrigung des K_m -Wertes durch Resveratrol zeigen, unterstützt⁹⁶. Des Weiteren konnte mit einem synthetischen STAC ebenfalls gezeigt werden, dass der STAC11 an die SBD bindet, die SBD sich daraufhin dem aktiven Zentrum nähert und dies zu einer aktivierten Konformation des Sirtuins führt⁶⁸.

Eine Aktivierung durch Kleinmoleküle ist ebenso für Sirt6 möglich. Fettsäuren sind in der Lage bei hohen Konzentrationen Sirt6-abhängige Deacetylierung zu aktivieren⁶³. Eine stärkere Aktivierung kann durch synthetische Moleküle, die auf einem Pyrrolo[1,2- α]quinoxalin-Gerüst basieren und in einem Sirt6-spezifischen Acyltunnel binden, hervorgerufen werden¹⁰¹. Sirt1 und 6 zeigen, dass eine isoformspezifische, potente Aktivierung von Sirtuinen möglich ist. Sirt3, als einziges mitochondriales Sirtuin

mit robuster Deacetylaseaktivität ist ein weiteres attraktives Ziel zur Aktivierung durch Kleinmoleküle²⁵. Dennoch gibt es bisher keine potenten, isoformspezifischen Sirt3-Aktivatoren. Mai *et al.* konnten unter Verwendung von 1,4-Dihydropyridin-Molekülen (DHP) die Aktivierung von Sirt3 zeigen. Dieses Gerüst wurde durch rationales Design basierend auf dem strukturellen Vergleich von NAM und 2-Benzanilinoamid entworfen (Abbildung 6) und besitzt Potential zur potenten, isoformspezifischen Sirt3-Aktivierung. Der genaue Aktivierungsmechanismus von Sirt3 durch DHPs konnte bisher jedoch nicht aufgeklärt werden¹⁰².

Ein weiterer Naturstoff, der die Aktivität von Sirtuinen reguliert, ist Quercetin. Diese Verbindung wird als Aktivator von Sirt1 beschrieben und soll Sirt6 bei niedrigen Konzentrationen inhibieren und bei hohen Konzentrationen aktivieren^{96,103}. Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde Quercetin als Sirt6-Aktivator charakterisiert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Quercetin die anderen Isoformen inhibiert¹⁰⁴. Der genaue Mechanismus zur Sirtuinregulation sowie die unterschiedliche Wirkung auf die Isoformen was bisher unklar.

Der komplexe katalytische Mechanismus der Sirtuine bietet verschiedene Möglichkeiten zur Inhibition. Da die Sirtuinisoformen unterschiedliche Präferenzen für die Peptidsubstrate sowie Acylmodifikationen haben, ist es möglich selektive Inhibitoren basierend auf der Bindung zur Acylpeptidtasche zu entwickeln^{31,55,64}. Thioacylpeptide bilden ein sehr stabiles Thioalkylimidat-Intermediat, welches weniger anfällig für Hydrolyse ist. Somit bleibt es am Enzym gebunden und blockiert es¹⁰⁵. Auf diese Weise konnten bereits Inhibitoren für die Isoformen Sirt1,2,5 und 6 entwickelt werden^{106–108}. Die peptidbasierten Inhibitoren haben allerdings den Nachteil, dass sie eine geringe Zellpermeabilität aufweisen und Peptide in der Zelle schnell abgebaut werden. Der Fokus in der Entwicklung von Inhibitoren lag insbesondere auf den Isoformen 1-3. Zum Beispiel gibt es Inhibitoren für Sirt2 mit hoher Isoformspezifität und Wirksamkeit. Diese binden in einer Sirt2-selektiven Tasche, welche sich in Folge der Bindung des Liganden im aktiven Zentrum bildet^{109,110}. Die Verbindung SRT1720 ist ein wirksamer aber nur teilweise selektiver Inhibitor für Sirt3¹¹¹. Auf Sirt1 hat diese Verbindung hingegen eine aktivierende Wirkung¹¹². Die Erkenntnisse, welche mit Hilfe der bisher untersuchten Modulatoren erbracht werden konnten, verdeutlichen die

Herausforderungen zur Entwicklung selektiver und wirksamer Kleinmoleküle, welche das Potential zur Anwendung als Medikament haben.

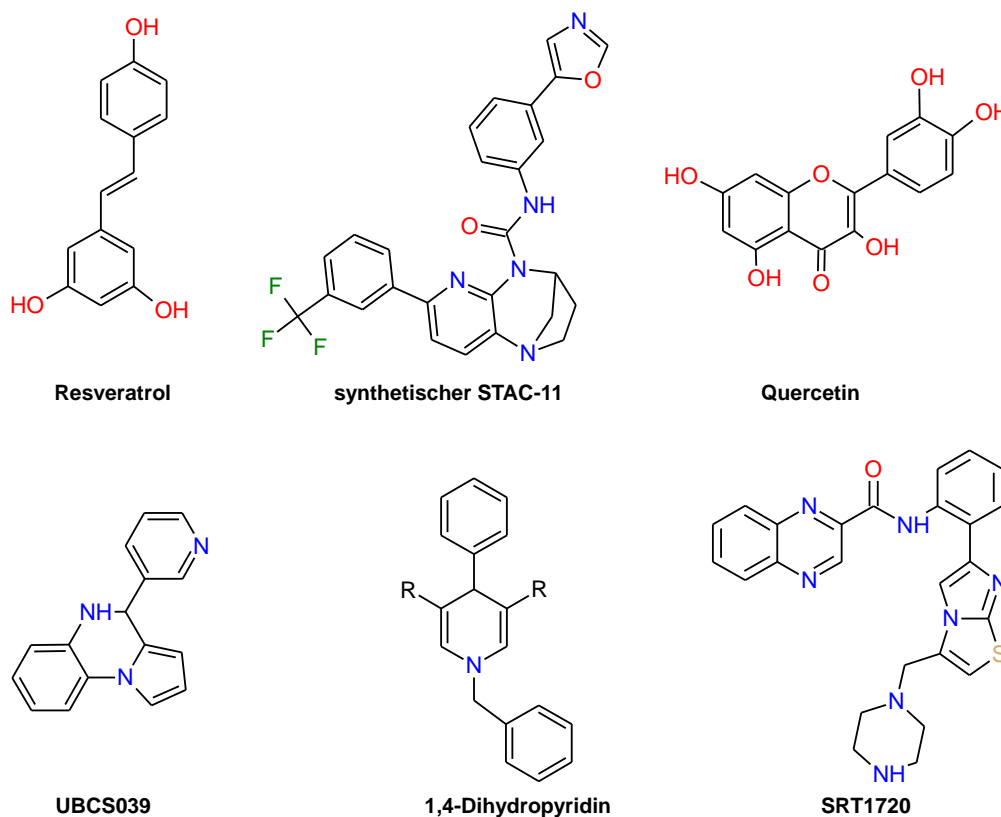


Abbildung 6 pharmakologische Kleinmoleküle mit Einfluss auf die Sirtuinaktivität. Dargestellt sind die chemischen Strukturen bekannter Inhibitoren und Aktivator von Sirtuinen. Für geeignete Substrate stimuliert der Polyphenol Resveratrol die Aktivität von Sirt1. Ebenfalls einen stimulierenden Einfluss auf die Sirtuinaktivität haben die Aktivator STAC-11 (Sirt1), Quercetin (Sirt6), UBCS039 (Sirt6), 1,4-Dihydropyridin-Gerüst (Sirt1-3) und SRT1720 (Sirt1). Der Sirt1 Aktivator SRT1720 ist gleichzeitig ein Inhibitor für Sirt3. Der Sirt6-Aktivator Quercetin inhibiert Sirt1,2,3 und 5.

1.3.3 Regulation durch Proteine

Neben Kleinmolekülen wird die Aktivität der Sirtuine auch durch Proteine reguliert. Bekannte Interaktionspartner sind die Proteine *deleted in breast cancer 1* (DBC1) und *active regulator of SIRT1* (AROS) sowie das HIV-Protein *transactivator of transcription* (Tat).

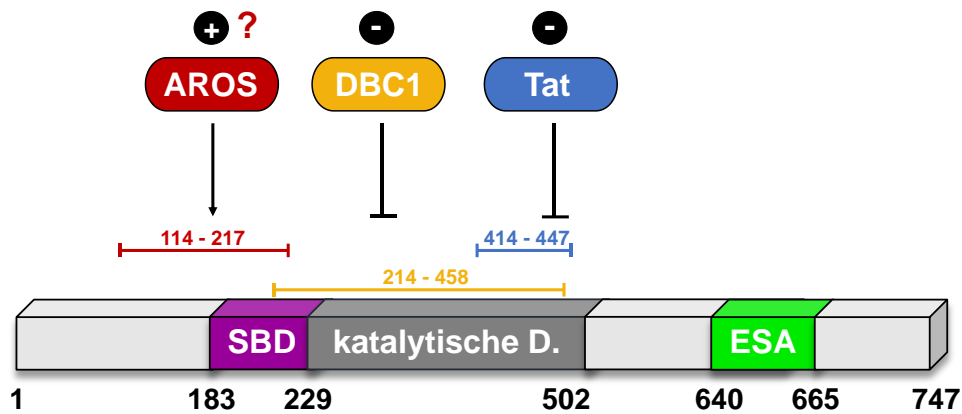


Abbildung 7 Die Sirt1-Aktivität wird durch Bindung mit anderen Proteinen reguliert. Das als Aktivator beschriebene AROS-Protein bindet vermutlich an den N-Terminus von Sirt1. DBC1 scheint mit der ESA-Region um die Bindung an der katalytischen Domäne zu konkurrieren und dadurch Sirt1 zu inhibieren. Das Sirt1-Substrat Tat bleibt vermutlich nach Deacetylierung gebunden, blockiert dadurch den Zugang anderer Substrate und inhibiert auf diese Weise die Sirt1-Aktivität¹¹³.

DBC1 bindet mit seinem N-Terminus an die katalytische Domäne von Sirt1 und inhibiert sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Deacetylase Aktivität. Infolge der Sirt1-Inhibition steigt die Acetylierung an p53 und die p53-abhängige Apoptose wird gefördert^{114,115}. Auf diese Weise scheint DBC1 die Tumorbildung in Brustkrebs und die Proliferation einer Lungenkrebs-Zelllinie zu verhindern^{116,117}. Die Sirt1/DBC1-Interaktion kann durch Carboxamide wie dem Sirt1-Inhibitor Ex-527 vollständig verhindert werden¹¹⁸. Ex-527 bindet in der Sirt1-Tasche, welche den Nicotinamid-Anteil von NAD⁺ aufnimmt. Interessanterweise ist Sirt1 in der Lage ein potenzielles Kernlokalisierungssignal von DBC1 zu deacetylieren. Der Inhibitor NAM führt nicht zur Aufhebung der Sirt1-DBC-Interaktion. Dies spricht gegen eine Inhibition, die auf der Bindung des DBC1 als Substrat beruht¹¹⁹. Stattdessen scheint DBC1 mit der ESA-Region um die Bindung an der katalytischen Domäne zu konkurrieren und eine Sirt1-Aktivierung durch die ESA-Region zu verhindern^{49,66}.

Das Protein Tat wurde als ein Substrat von Sirt1 identifiziert. Acetyliertes Tat ist für die transkriptionelle Aktivierung des HI-Virus notwendig. Ohne das Protein erweist sich die Elongation als ineffizient. Die Tat-vermittelten HIV-Transkription scheint dabei über die Acetylierung und Deacetylierung des Tat-Proteins reguliert zu werden. Sirt1 dient dabei der Wiederherstellung des deacetylierten Tat-Proteins¹²⁰. Darüber hinaus inhibiert Tat die Sirt1-Deacetylierung der Untereinheit p65 von NF-κB. Der Transkriptionsfaktor NF-κB ist für die T-Zellen Aktivierung notwendig und die

Acetylierung der Untereinheit p65 verstärkt die transkriptionelle Aktivität des Proteins. Tat scheint daher die normale Funktion von Sirt1 als negativer Regulator der T-Zellen Aktivierung zu hemmen und dadurch zu einer Überaktivierung von Immunzellen während einer HIV-Infektion beizutragen. Vermutet wird, dass Tat zunächst selbst von Sirt1 deacetyliert wird, an der Deacetylase gebunden bleibt und dadurch den Zugang von anderen Substraten blockiert¹²¹.

1.3.4 Der Sirt1 Interaktionspartner AROS

Das einzige Protein, welches bisher als Aktivator für Sirt1 beschrieben wurde, ist AROS. Es besteht aus 136 Aminosäuren und ist sowohl im Nukleus als auch im Cytoplasma lokalisiert^{122,123}. Im Jahr 2006 wurde es im Komplex mit dem ribosomalen Protein S19 entdeckt und als *S19 binding protein* (S19BP) bezeichnet¹²⁴. Es konnte gezeigt werden, dass AROS mit der kleinen 40S Untereinheit des Ribosoms assoziiert. Es ist an der ribosomalen Biogenese beteiligt und spielt eine Rolle in der Regulation der ribosomalen Funktion. Die Sequenz von AROS besitzt keine typischen Sequenzmotive, bis auf nukleare Export und Importsignale¹²³. Bisher gibt es weder eine Struktur von humanem AROS noch von einem homologen Protein.

2007 wurde es erstmals von Kim *et al.* als Interaktionspartner von Sirt1 beschrieben. Mit Hilfe von *yeast two-hybrid* Experimenten konnte gezeigt werden, dass das humane AROS mit dem humanem Sirt1 interagiert. Dies wurde in Coimmunopräzipitation- und Pulldownexperimenten bestätigt. Als Bindestelle wurde der N-Terminus einschließlich der SBD von Sirt1 identifiziert. Interaktionen zu Sirt2-7 konnten nicht nachgewiesen werden. Die Studie legt somit nahe, dass es sich um eine isoformspezifische Bindung mit Sirt1 handelt¹²². Des Weiteren lassen Studien von Conrad *et al.* vermuten, dass die Interaktion von Sirt1 und AROS durch eine PTM reguliert wird. Sie identifizierten eine Phosphorylierung an dem Serin 682 von Sirt1, die zu einer Abschwächung des Komplexes mit AROS führt. Somit scheint auch der C-Terminus von Sirt1 an der Bindung mit AROS beteiligt zu sein¹²⁵.

Kim *et al.* zeigten, dass die direkte Interaktion von AROS mit Sirt1 zu einer erhöhten Deacetylierung des Sirt1-Substrates p53 führte. Die Funktion des Tumorsupressor und Transkriptionsfaktors p53 wurde dadurch unterdrückt. Infolge dessen kam es zu einem vermehrten Überleben der Zellen trotz DNA-Schädigung¹²². Die durch AROS erhöhte Sirt1-Deacetylierung von p53 erfolgt aber nur nach Zellschädigung. Des Weiteren

führten Experimente mit Krebszellen und gesunden Zellen zu der Erkenntnis, dass AROS keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit von gesunden Zellen hat, aber das Überleben von Krebszellen fördert¹²⁶. Der Mechanismus der Sirtuinaktivierung durch AROS ist bisher nicht geklärt. Andere Gruppen zeigten mit *in vitro* Experimenten, dass es sich, entgegen der bisherigen Annahmen, nicht um einen Aktivator handelt, sondern AROS Sirt1 stattdessen inhibiert^{127,128}. Lakshminarasimhan *et al.* konnten in einem fluoreszenzbasierten Aktivitätstest keine AROS-vermittelte Sirt1-Aktivierung ermitteln. Die Daten deuten lediglich auf eine Inhibition durch AROS hin. In dieser Studie wurde zum ersten Mal die rekombinante Expression in *E. coli* beschrieben und das aus Einschlusskörperchen gewonnene AROS als ein Protein mit ungewöhnlicher aber definierter Konformation charakterisiert¹²⁸. Kokkola *et al.* stellten mit Hilfe von Coimmunopräzipitations-Experimenten ebenso eine physikalische Interaktion der beiden Volllängeproteine fest. Im Gegensatz zu bisherigen Ergebnissen konnten sie keine AROS-vermittelte Aktivierung von Sirt1 reproduzieren. Stattdessen zeigten sie in zwei verschiedenen Aktivitätstests die Inhibition der Sirt1-Deacetylaseaktivität durch AROS. Darüber hinaus konnte in Coimmunopräzipitations-Experimenten die Interaktion lediglich mit dem Volllänge Sirt1 aber nicht mit einer Sirt1-Deletionsvariante ohne die ersten 114 Aminosäuren festgestellt werden. Dies steht im Widerspruch mit den Kim *et al.*, die zeigten, dass die Aminosäuren 114 bis 217 ausreichend für die Interaktion mit AROS sind. Die Überexpression von AROS führte in den durch Kokkola *et al.* durchgeführten *in vivo*-Experimenten zu keiner Aktivierung von Sirt1. Die Autoren vermuteten, dass diverse Bedingungen wie das verwendete Puffersystem oder der biologische Kontext die Interaktion von AROS und Sirt1 beeinflussen könnten. Eine systematische Überprüfung der Komplexbildung in Abhängigkeit von z.B. der Pufferbedingung wurde nicht durchgeführt¹²⁷.

1.4 Zielsetzung

Der Naturstoff Quercetin ist in der Lage die Sirtuinaktivität zu regulieren. Der Regulationsmechanismus ist jedoch ungeklärt. Hinzu kommt, dass sich die Wirkung von Quercetin zwischen Sirt6 und den anderen Isoformen unterscheidet. Mit Hilfe einer Kristallstruktur des Sirt2/Quercetin-Komplexes sollten die strukturellen Grundlagen zur Sirtuinregulation aufgeklärt werden und somit zum Verständnis der Quercetin-vermittelten, Sirt6 spezifischen Aktivierung bzw. der Inhibierung der anderen Isoformen beitragen.

Aufgrund der Tatsache, dass die Aktivierung von Sirt3 therapeutisches Potenzial besitzt, es jedoch an wirksamen, isoformspezifischen Aktivatoren mangelt, sollte mit Hilfe des kristallografischen Screenings mit einer Fragment-Bibliothek neue Liganden für Sirt3 identifiziert werden. Die Analyse der Sirt3/Fragment-Strukturen sollte zum Verständnis und Weiterentwicklung von Bindungsstellen für Liganden beitragen. Die Sirt3-Interaktion identifizierter Liganden sollte anschließend in Aktivitäts- und Bindetest untersucht werden.

Des Weiteren sollte die Sirt1-Regulation durch den endogen Interaktionspartner AROS genauer untersucht werden. Über das Protein, welches bisher als erster und einziger Aktivator von Sirt1 beschrieben wurde, ist nur wenig bekannt. Deshalb sollte zunächst das AROS-Protein genauer charakterisiert werden. Die bisherigen Versuche das unlöslich exprimierende Protein in *E. coli* rekombinant herzustellen und aus Einschlusskörperchen zu renaturieren, resultierten in geringen Ausbeuten. Daher sollte ein Renaturierungsprotokoll etabliert werden, um lösliches, reines Protein in ausreichenden Mengen zur biophysikalischen und strukturellen Charakterisierung von AROS sowie dessen Interaktion mit Sirtuinen zur Verfügung zu stellen. Mit Hilfe von bioinformatischen und spektroskopischen Methoden (CD, NMR) sollten Aussagen zur Struktur des Proteins getroffen werden. Ziel war zudem die Strukturaufklärung mit Röntgenstrukturanalyse. Da die bisherigen Erkenntnisse der AROS-vermittelte Regulation von Sirt1 sich widersprechen, sollte die Interaktion genauer untersucht werden. Dazu sollte zunächst ein stabiler Komplex aus beiden Proteinen durch Optimierung des verwendeten Puffersystems hergestellt werden. Die Regulation sollte anschließend in verschiedenen Aktivitätstest untersucht werden. Des Weiteren sollte unter Verwendung von Deletionsvarianten beider Proteine in Aktivitätstest, Bindungsstudien, Quervernetzungs- und NMR-Experimenten der Interaktionsbereich genauer analysiert werden. Ebenso sollten Erkenntnisse über Regulationsmöglichkeiten durch Pseudophosphorylierungen der beiden Proteine und die Isoformspezifität der Interaktion gewonnen werden. Eine Strukturaufklärung mittels Röntgenstrukturanalyse des AROS/Sirtuin-Komplexes sollte einen Einblick über die molekularen Mechanismen der AROS-Regulation geben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Standards

Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Fluka (Neu-Ulm), GERBU (Gaiberg), Grüssing (Filsum), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Deisenhof) und VWR International (West Chester, USA) bezogen. Enzyme zur DNA-Modifizierung sowie DNA-Standards stammten von der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main) sowie Biorad (Feldkirchen). DNA-Oligonukleotide zur PCR-Amplifikation wurden von Eurofines Genomics (Ebersberg) synthetisiert. Enzyme für Aktivitätstest wurden von Fermentas (St. Leon-Rot), Promega (Walldorf), Sigma-Aldrich (Deisenhof) oder New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen. Tobacco Etch Virus (TEV)-Protease, Nicotinamidase sowie die Sirtuine hSirt2, hSirt5 und hSirt6 wurden von den technischen Assistenten laborintern hergestellt. Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Eppendorf (Wesseling-Berzdorf), Molecular Dimensions (Sheffield, UK), Quiagen (Düsseldorf), Greiner Bio-One (Frickenhausen) bezogen. Substrat-Peptide für Aktivitätstest sowie AROS-Peptide wurden von GL Biochem (Nanjing, CHN) synthetisiert. Das synthetische *Fluor de Lys-1* (FdL-1) Peptid mit dem C-terminalen Aminomethyl-Coumarin wurde von dem Lehrstuhl von Prof. Dr. Mike Schutkowski (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle) zur Verfügung gestellt. Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden mit zweifach destilliertem Wasser hergestellt und der pH-Wert bei 20 °C bzw. 4 °C eingestellt.

2.1.2 Bakterienstämme

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden mit den *E. coli*-Stämmen GC5, DH5 α , XL-1 Blue und OneShot® Top10 durchgeführt. Die heterologe Überexpression der Sirtuine erfolgte in dem *E. coli*-Stamm BL21 CodonPlus (DE3)-RIL. Dieser besitzt einen Vektor, welcher für zusätzliche Säuger-tRNS kodiert und über ein Gen, welches eine Chloramphenicolresistenz vermittelt. Das unmarkierte AROS wurde in dem *E. coli*-Stamm C43 (DE3) und das isotopenmarkierte AROS in dem *E. coli*-Stamm LOBSTR-BL21(DE3) exprimiert. Die verschiedenen *E. coli*-Stämme mit ihrem entsprechenden Genotyp sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1 Die verwendeten *E. coli* Stämme und deren Genotypen sowie Resistenzen.

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp (Resistenz)
GC5	F ⁻ Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_k⁻</i> , <i>m_k⁺</i>) <i>phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1 λ-T1R</i>
DH5α	F ⁻ Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_k⁻</i> , <i>m_k⁺</i>) <i>phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1 λ-T1R</i>
XL-1 Blue	F ['] <i>proAB lacIqZ</i> ΔM15 Tn10 <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> (Tet^R)
OneShot® Top10	Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (SmR) <i>endA1 nupG</i> (Strep^R)
C43 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal dcm</i> (keine Resistenz)
BL21 CodonPlus (DE3)-RIL	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>dcm⁺ Tetr gal endA Hte</i> <i>[argU ileY leuW]</i> (Cam^R)
LOBSTR-BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>dcm⁺ Tetr gal endA Hte</i> <i>[argU ileY leuW]</i> (keine Resistenz)

2.1.3 Nährmedien, Antibiotika und Induktor

Nährmedien wurden mit vollentsalztem Wasser hergestellt und durch Autoklavieren sterilisiert. Die Ampicillin-, Chloramphenicol und IPTG-Stammlösungen wurden mit Reinstwasser (Millipore, Darmstadt) hergestellt und mit einer Membran der Porengröße 0,22 µm (A. Hartenstein, Würzburg) sterilfiltriert. Antibiotika und Induktor wurden steril zugegeben.

Tabelle 2 Die verwendeten Nährmedien und -böden für molekularbiologische Arbeiten und zur Überexpression der rekombinanten Proteine sowie Antibiotika- und Induktorstammlösungen.

Nährmedium, Antibiotika, Induktor	Zusammensetzung
<i>lysogeny broth</i> (LB)-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl
LB-Agarplatten	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar
2xYT Medium	16 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl

Material und Methoden

Minimalmedium	6 g/l Na ₂ HPO ₄ , 3 g/l KH ₂ PO ₄ , 5 g/l NaCl, 0,5 g/l (¹⁵ NH ₄) ₂ SO ₄ , 1 mM MgSO ₄ , 0,3 mM CaCl ₂ , 1 mg/ml Biotin, 1 mg/ml Thiamin, 2 % (v/v) Glukose, 1x <i>trace elements</i>
Ampicillin	100 mg/mL
Chloramphenicol	34 mg/mL
Isopropyl-β-D-thiogalacto- pyranosid (IPTG)	1 M

2.1.4 Oligonukleotide

Die Primer, welche zur Herstellung verschiedener AROS- bzw. Sirt1-Varianten verwendet wurden, sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3 Die zur PCR-Amplifikation verwendeten Oligonukleotide.

Name	Sequenz	Restrik- tionsstelle	Stop- codon	Richtung
hAROS-136-XhoI- 3'PCR	TGTCCTCGAGTTATCAGC TGCCGAAGTATTCCTG	XhoI	Ja	rückwärts
aros_1_lic_pET15b_f	CACAGCAGCGGCCTGGT GCCGCGCGGCAGCCATA TGTCCGCCGCC	NdeI	Nein	vorwärts
AROS39NdeI	GCCATATGACGAAGGCA ATTCAGGCC	NdeI	Nein	vorwärts
AROS89stXho	TATACTCGAGCTAAGACT CAGCCACGGT	XhoI	Ja	rückwärts
Sirt1-5NdeI183	TATACATATGGGTCCATA TACTTTTGTTCAGCAACA TC	NdeI	Nein	vorwärts
Sirt1_3'505GGGS2	GCTTCCACCGCCGCTGC CTCCACCTACAGGGTTAC AGCAAAGTT	keine	Nein	rückwärts

Sirt1_5'641GGGS2	GGTGGAGGCAGCGGCG GTGGAAGCCAGTATCTG TTTTTGCCACCAAAT	keine	Nein	vorwärts
S1-3BamHI687st	TATAGGATCCCTATTCTT CTAAACTTGG	BamHI	Ja	rückwärts
S1_S682E_3st687	TATAGGATCCCTATTCTT CTAAACTTGGTTCCTGGC ATGT	BamHI	Ja	rückwärts

2.1.5 Plasmide

Die verwendeten rekombinanten Plasmide sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4 Die verwendeten Plasmide zur Überexpression der rekombinanten Proteine.

Vektor	Zielgen	Resistenz	tag ^a	Schnitt- stelle
pET19bmod ^b	hAROS(1-136); hAROS(1-89); hAROS(39-136)	Amp	His ₆	TEV
pET19bmod ^b	miniSirt1; miniSirt1ex687wt; miniSirt1S682E; miniSirt1ΔSTAC; miniSirt1ΔESA	Amp	His ₆	TEV
pET32a-TEV ^c	hSirt1; hSirt1(144-230)	Amp	His ₆ -TrxA	TEV
pET19b-SUMO ^b	hSirt2(55-356)	Amp	His ₆ -SUMO Sumo	Senp2
pVFT3S	hSirt3(118-399)	Kan	His ₆ -TrxA	TEV
pET-151/D-TOPO	hSirt5(34-302); Sirt6(13-308)	Amp	His ₆	TEV

a: tag befindet sich N-terminal; b: modifiziert von pET19b c: modifiziert von pET32a

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Sterilisation

Für das Arbeiten mit Bakterien wurden alle verwendeten Materialien, Medien und Lösungen bei 121 °C und 2 bar für 20 min in einem *DX-150 Autoklav* (Systec, Linden)

sterilisiert. Hitzeinstabile Lösungen wurden mit einer sterilen Membran der Porengröße 0,22 µm (A. Hartenstein, Würzburg) filtriert.

2.2.2 Transformation kompetenter Zellen mittels Hitzeschock

Zur Transformation chemischkompetenter Zellen mit Plasmid-DNA wurden 50 µl Zellen mit 100-200 ng DNA versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte der Hitzeschock bei 42 °C für 45 sec mit anschließender Inkubation in 1 mL LB-Medium bei 37 °C und 500 rpm in einem Thermomixer *compact* (Eppendorf, Hamburg) inkubiert.

2.2.3 Heterologe Überexpression rekombinanter Proteine

Zur heterologen Überexpression von rekombinanten Proteinen wurden die jeweiligen transformierten Zellen auf Agar-Platten ausgestrichen, über Nacht in einem Brutschrank (Memmert, Schwabach) bei 37 °C kultiviert und zur Inokulation verwendet. *E. coli* BL21 CodonPlus (DE3)-RIL-Vorkulturen für Sirtuine sowie *E. coli* C43 (DE3)-Vorkulturen für unmarkiertes AROS wurden in LB-Medium (100 ml in 500 ml Schikanekolben) mit 100 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol (nicht für C43-Vorkulturen) bei 25 °C und 120 rpm in einem New Brunswick™ Innova® 42-Vorkultureschüttler (Eppendorf, Hamburg) über Nacht angezogen. Zur Expression wurden 1 L LB-Medium in 2 L Schikankolben mit 10 mL der Vorkultur inokuliert, mit dem entsprechendem Antibiotikum versetzt und bei 37 °C und 120 rpm geschüttelt (HT Multitron Kultureschüttler, Infros, Bottmingen). Bei einer optischen Dichte (OD) der Wellenlänge 600 nm zwischen 0,6-0,8 erfolgte ein Kälteschock und der Start der Expression durch Zugabe von 0,2 mM (hSirt1-Konstrukte) bzw. 0,5 mM (hSirt3) Isopropyl-β-D-Thiogalactosid (IPTG). Die Proteine wurden für 16 h bei 16 °C (hSirt1-Konstrukte) bzw. 20 °C (hSirt3) im Schüttler exprimiert. Die Expression von unmarkiertem AROS erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG und ohne Kälteschock bei 37 °C für 16 h.

Für die Expression von ¹⁵N- bzw. ¹⁵N-¹³C-markiertem AROS wurden 0,5 L 2xYT-Medium in 2 L Schikankolben direkt von je einer Agar-Platten mit *E. coli* LOBSTR - BL21(DE3) inokuliert und bei 37 °C und 120 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 5-6 geschüttelt. Es folgte eine Zentrifugation der Kulturen für 12 Minuten bei 6.000 rpm (Avanti J26XP, JA8100-Rotor, Beckman, Krefeld). Die Zellpellets aus 0,5 L Kultur wurden anschließend in 0,5 Liter Minimalmedium mit dem jeweiligen Isotopen

resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für 90 Minuten bei 37 °C und 120 rpm mit anschließender Induktion der Expression durch 1 mM IPTG. Die Expression erfolgte bei 37 °C und 120 rpm für 4 h. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Avanti J26XP, JA8100-Rotor, Beckman, Krefeld) bei 5.000 rpm für 15 Minuten geerntet.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Polymerasekettenreaktion

Ein Ansatz für die Polymerasekettenreaktion¹²⁹ (*polymerase chain reaction*, PCR) setzte sich entsprechend der Tabelle 5 zusammen und wurde wie in Tabelle 6 in einer FlexCycler PCR Maschine (Analytik Jena AG, Jena) durchgeführt.

Für Kolonie-PCRs wurden Klone von einer LB-Agar-Platte isoliert und in 10 µL ddH₂O resuspendiert. Davon wurde 1 µL als Template für die PCR-Reaktion verwendet.

Tabelle 5 Komponenten und deren Konzentration für einen PCR-Ansatz.

Komponente	Finale Konzentration
5x Phusion HF oder GC Buffer	1x
10 mM dNTPs	200 µM
10 µM Primer 1	0,5 µM
10 µM Primer 2	0,5 µM
Template DNA	100-250 ng
DMSO	2 %
Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase	1 U je 50 µL Ansatz
Wasser	Ad 50 µL

Tabelle 6 Durchführung der PCR-Reaktion einschließlich der einzelnen Schritte mit Temperatur- und Zeitangaben.

Schritt	Temperatur in °C	Zeit in Sekunden
Initiale Denaturierung	95	30
30 Zyklen	Denaturierung	95
	Primer-Anlagerung	72
	Elongation	72
Finale Elongation	72	300

2.3.2 Agarosegelelektrophorese

Um DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen, wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Die DNA-Proben und der DNA-Standard wurden mit DNA-Ladepuffer (final 2 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,2 mM EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt. Anschließend erfolgte die Elektrophorese mit 1 % (w/v) Agarosegelen, welche 0.01% (v/v) *Midori Green Advance* (Biozym, Hessisch Oldendorf) enthielten, in TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,2 mM EDTA) unter Verwendung eines *Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System* (Biorad, Feldkirchen) bei 180-200 V und konstanter Stromstärke von 100 mA für 20-40 min. Die Visualisierung erfolgte unter UV-Licht.

2.3.3 Modifikation von DNA-Fragmenten

Ein Restriktionsansatz enthielt 1 µg Vektor bzw. PCR-Produkt, 1 µL 10x CutSmart® Puffer, je 1 µL Time-Saver™ Restriktionsenzym 1 und 2 mit 50 U/µL (Puffer und Enzym von New England Biolabs, Frankfurt am Main) und wurde mit ddH₂O auf 50 µL aufgefüllt. Die Reaktion wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Inaktivierung der Enzyme bei 65 °C für 20 min. Der geschnittene Vektor wurde durch Zugabe von 6 µL 10x antarktischer Phosphatase-Reaktionspuffer, 1 µL antarktischer Phosphatase (Puffer und Enzym von *New England Biolabs*, Frankfurt am Main) sowie 3 µL ddH₂O für 1 h bei 37 °C dephosphoryliert und anschließend mit dem Favorprep™ Gel/PCR Purification Mini Kit (*Favorgen Biotech Corp.*, Wien) gereinigt.

2.3.4 Reinigung der PCR-Produkte und der Plasmid-DNA

Die Reinigung der PCR-Produkte sowie der mit Restriktionsenzymen modifizierten Produkte erfolgte mit dem Favorprep™ Gel/PCR Purification Mini Kit (*Favorgen Biotech Corp.*, Wien). Für die Plasmid-Präparation wurde der Favorprep™ Plasmid-Extraktions-Minikit (*Favorgen Biotech Corp.*) verwendet. Die Reinigung erfolgte nach Herstellerangaben. Anstelle des Elutionspuffers wurde die DNA in ddH₂O eluiert. Um die Ausbeute zu erhöhen wurde das ddH₂O auf 60 °C vorgewärmt.

2.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Ein Ligationsansatz enthielt 100 ng Vektor mit drei- bzw. fünffachen molaren Überschuss an PCR-Produkt, 1 µL der T4 DNA-Ligase (400 U/µl) in 2 µl 10x T4 DNA-Ligase Puffer (beides von New England Biolabs, Frankfurt am Main) und wurde auf 20 µL mit H₂O aufgefüllt. Die Ligationsreaktion wurde bei 20 °C für 1 h durchgeführt und

anschließend in *E. coli* BL21(DE3) OneShot® Top10 oder *E. coli* BL21(DE3) XL1-Blue Zellen transformiert.

2.3.6 DNA-Sequenzierung

Alle Plasmidkonstrukte wurden zur Kontrolle von den Firmen Eurofins Genomics (Ebersberg) bzw. Microsynth (Balgach, Schweiz) sequenziert.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte eine Absorptionsmessung bei 280 nm mit dem Spektrophotometer NanoDrop2000 (Thermo Scientific, Braunschweig). Die Konzentration wurde mit dem Lambert-Beer-Gesetz (Gleichung 1) ermittelt.

$$c \left[\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right] = \frac{E_{280 \text{ nm}}}{\varepsilon \left[\frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right] \cdot d [\text{cm}]} \quad \text{Gleichung 1}$$

c = Proteinkonzentration

E = Absorption bei 280 nm

ε = theoretische Extinktionskoeffizient

d = Schichtdicke

Der theoretische Extinktionskoeffizient wurde mit dem Programm Prot-Param (www.expasy.org¹³⁰) ermittelt und die Schichtdicke betrug 0,1 cm.

2.4.2 Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Analyse von Proteinlösungen wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) unter denaturierenden Bedingungen mit einem diskontinuierlichem Tris-Glycin-Puffersystem nach *Laemmli*¹³¹ durchgeführt. Die Trenngele hatten eine Trennstrecke von 5 cm, eine Acrylamidkonzentration von 15 % und ein Verhältnis Acrylamid:Bisacrylamid von 35:1. Das Trenngel wurde mit einem 2 cm langen Sammelgel (Acrylamidkonzentration von 5 %) überschichtet. Die Proteinproben wurden mit SDS-Ladepuffer (50 mM Tris/HCl pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 100 mM β -Mercaptoethanol, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und für 5 min bei

95 °C gekocht. Die Elektrophorese erfolgte unter Verwendung einer Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad, Feldkirchen) in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS) bei einer Spannung von 180 V für 70-80 min.

Tabelle 7 Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für eine SDS-PAGE.

Komponente	Sammelgel	Trenngel
Tris/HCl pH 6,8	125 mM	375 mM
SDS (w/v)	0,1 %	0,1 %
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (w/v)	0,1 %	0,1 %
Ammoniumpersulfat (w/v)	0,65 %	0,6 %
Polyacrylamid	5 %	15 %

2.4.3 Färbung mit Coomassie-Blau

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel 1-2 h mit Färbelösung (115 µg/ml Coomassieblau G-250, 6,7 % (v/v) Ethanol, 4,4 % (v/v) H₃PO₄, 10 mg/ml β-Cyclodextrin) inkubiert und anschließend in Wasser entfärbt.

2.4.4 Diskontinuierliche native Protein-Gelelektrophorese

Für die Analyse des oligomeren Zustands von Proteinen wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen mit einem diskontinuierlichem Tris-Histidin-Puffersystem nach *Niepmann and Zheng*¹³² durchgeführt. Es wurde ein Gel mit einem Polyacrylamidgradienten von 5-35 % verwendet. Dazu wurden nacheinander die 5-prozentige Lösung zur Hälfte, dann die 35-prozentige Lösung und anschließend 2-3 Luftblasen mit einer Glaspipette aufgezogen. Die Proteinproben wurden mit Ladepuffer (Tris-Cl pH 8.0, 0.5 % Serva Blue G) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte unter Verwendung einer Mighty Small II SE 250 Mini-Vertical Gel Electrophoresis Unit (Amersham Biosciences, Freiburg) mit einem Kathodenpuffer (100 mM Tris-histidine pH 8.0, 0.002 % Serva Blue G) und einem Anodenpuffer (100 mM Tris-Cl, pH 8.8) bei einer Spannung von 15 V/cm und 4 °C für 1-2 h.

2.4.5 Zellaufschluss

Die gefrorenen Zellen wurden in Puffer (5 ml/g Zellen) resuspendiert und mit einer Proteaseinhibitor-Tablette (Roche, Mannheim) und 50 µM PMSF versetzt. Es folgte ein mechanischer Zellaufschluss mittels Ultraschall. Dazu wurde ein Branson Sonifier

250 (Emerson, Saint Louis Missouri, USA) mit großer Spitze und einem *Duty Cycle* von 60 % bei Stufe 6 auf Eis (8 x je 1 min) verwendet.

2.4.6 Affinitätschromatographie

Die Reinigung der Proteine erfolgte mit Hilfe eines sechsfachen Histidin-*Tags*, welcher sich N-terminal befand. Dazu wurde, dass zu reinigende Material mit Ni²⁺-*cOmplete His-tag Purification Resin beads* (Roche, Mannheim) für 1 h Stunde inkubiert und anschließend in eine Gravitationssäule überführt. Waschritte erfolgten durch Zugabe des Waschpuffers (achtfache Säulenvolumen) und die Elution mit Elutionspuffer in fünffachen Säulenvolumen.

2.4.7 Proteolytische Entfernung des Affinitäts-tags

Zur Entfernung des Hexahistidin-*Tag* von rekombinanten Proteinen wurde die Proteinlösung mit der *TEV-Protease* (laborinterne Herstellung) in einem molaren Verhältnis von 1:20 (Protein:TEV-Protease) versetzt und gegen 4,5 L Dialysepuffer bei 4 °C für 16 h dialysiert. Dazu wurde ein Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgrenze (*molecular weight cut off*, MWCO) von 10 kDa verwendet.

2.4.8 Anionenaustauschchromatographie

Zur Reinigung von hSirt3 (118-399) wurde eine Anionenaustauschchromatographie mit einer HiTrap Q FF Säule (GE Healthcare, Solingen) an einer ÄKTA prime-System (GE Healthcare, Solingen) durchgeführt. Die Säule wurde mit 20 Säulenvolumen des HiTrap-Q-Puffers A äquilibriert. Anschließend wurde hSirt3 mit 0,3 mL/min geladen und mit einem Gradienten von 0-100 % HiTrap-Q-Puffer B in 50 Säulenvolumen eluiert. Dabei wurden 0,2 mL Fraktionen gesammelt und mit Hilfe der SDS-PAGE (Kapitel 2.4.2) hinsichtlich Reinheit analysiert.

2.4.9 Konzentrierung von Proteinen

Zur Volumenreduktion vor und nach der Größenausschlusschromatographie wurden die Proteine unter Verwendung von VivaSpin10-Ultrafiltrationseinheit (MWCO: 10 kDa, Sartorius, Göttingen) bzw. VivaSpin30-Ultrafiltrationseinheit (MWCO: 30 kDa, Sartorius, Göttingen) durch Zentrifugation (Zentrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg) bei 4.500 rpm und 4 °C konzentriert.

2.4.10 Größenausschlusschromatographie

Abschließend wurden die rekombinanten Proteine mittels Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) mit den Gelfiltrationssäulen Superdex S200 10/300, S200 16/60 oder S75 10/300 und dem Äkta Purifier-System (GE Healthcare, Solingen) bei 12 °C gereinigt. Dazu wurde das Säulenmaterial mit zwei Säulenvolumina Gelfiltrationspuffer-Puffer äquilibriert und 0,5-2 mL des Proteins mit einer Flussrate von 0,6 ml/min geladen. Es wurden 0,5 mL Fraktionen gesammelt und anschließend mit Hilfe der SDS-PAGE (Kapitel 2.4.2) hinsichtlich Reinheit analysiert.

2.4.11 Reinigung von rekombinanten Proteinen

Die Reinigung rekombinanter Proteine nach heterologer Überexpression in *E. coli* erfolgte nach dem Schema in Abbildung xxx. Alle Proteine wurden mit Histidin-tag exprimiert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt.

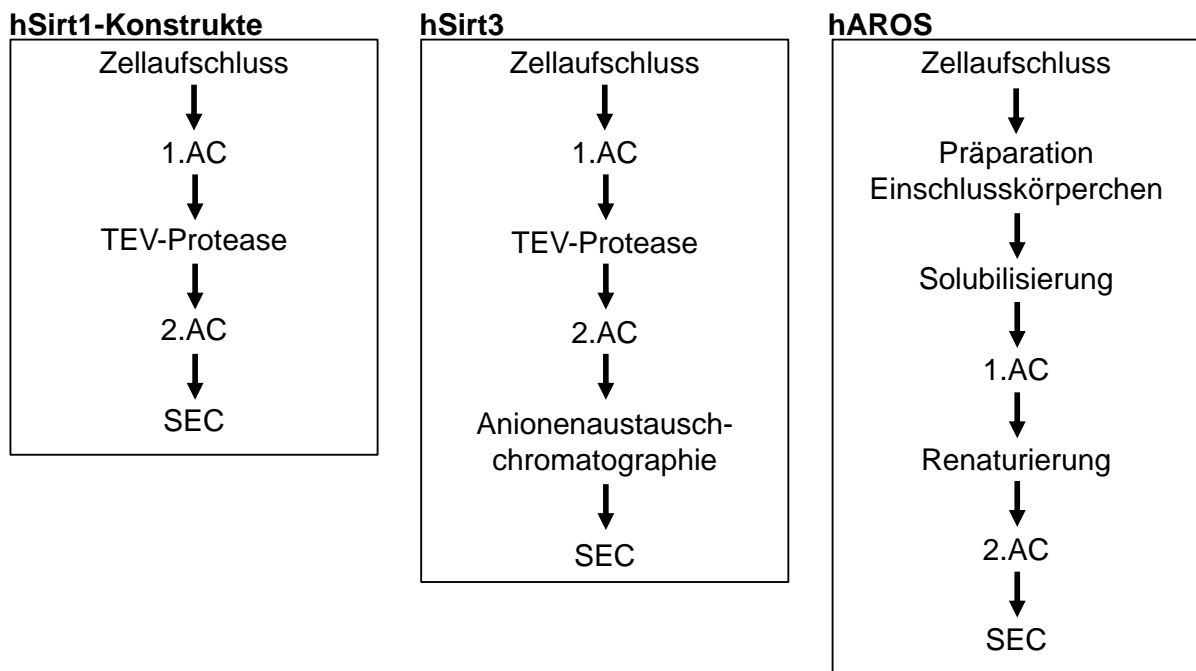


Abbildung 8 Reinigungsschemata rekombinanter Proteine nach heterologer Überexpression in *E. coli*. AC=Affinitätschromatografie; SEC=Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*)

Reinigung von Sirtuinen

Die Reinigung von Sirtuinen erfolgte aus dem löslichen Material nach Zellaufschluss entsprechend dem Schema in Abbildung 1 unter Verwendung der Puffer in Tabelle 8. Die aufgeschlossenen Zellen wurden dafür 45 Minuten bei 30.000 x g und 4 °C

zentrifugiert (Avanti J-30I, JA3050-Rotor, Beckman, Krefeld) und von dem unlöslichen Material getrennt. Zur Erhöhung der Löslichkeit des hSirt1 (144-230) wurde dem Aufschlusspuffer 0,1 % Triton hinzugefügt. Mit dem Überstand nach Zentrifugation wurde eine Affinitätschromatographie (1 mL *beads* je 4 g Zellen) durchgeführt. Anschließend erfolgte die Entfernung des Affinitäts-tags mit Hilfe der TEV-Protease und eine zweite Affinitätschromatographie. Die Reinheit des hSirt3 (118-399) war für die Kristallisationsexperimente nicht ausreichend und wurde durch den zusätzlichen Reinigungsschritt einer Anionenaustauschchromatographie erhöht. Als letzter Reinigungsschritt wurde eine SEC durchgeführt. Die Proteine wurden anschließend konzentriert.

Tabelle 8 Verwendete Puffer zur Reinigung verschiedener Sirtuin-Konstrukte.

Puffer	Zusammensetzung
<u>miniSirt1; miniSirt1ex687wt; miniSirt1S682E; miniSirt1ΔSTAC; miniSirt1ΔESA</u>	
Aufschlusspuffer	25 mM Hepes pH 7,5; 200 mM NaCl; 5% (v/v) Glycerin; 5 mM β-ME
Äquilibrierungspuffer	25 mM Hepes pH 7,5; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 5 mM β-ME; 20 mM Imidazol
Waschpuffer	25 mM Hepes pH 7,5; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 5 mM β-ME; 50 mM Imidazol
Elutionspuffer I	25 mM Hepes pH 7,5; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 5 mM β-ME; 250 mM Imidazol
Dialysepuffer	25 mM Hepes pH 7,5; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 5 mM β-ME
Elutionpuffer II	25 mM Hepes pH 7,5; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 5 mM β-ME; 5 mM Imidazol
Gelfiltrationspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ pH 7; 5 % (v/v) Glycerin; 10 mM DTT
<u>Sirt1 (144-230)</u>	
Aufschlusspuffer	50 mM Tris/HCl pH 8; 300 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 0,1 % (v/v) Triton
Äquilibrierungspuffer	50 mM Tris/HCl pH 8; 300 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 0,1 % (v/v) Triton; 10 mM Imidazol
Waschpuffer	50 mM Tris/HCl pH 8; 300 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 0,1 % (v/v) Triton; 40 mM Imidazol
Elutionspuffer I	50 mM Tris/HCl pH 8; 300 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 0,1 % (v/v) Triton; 250 mM Imidazol

Material und Methoden

Dialysepuffer	50 mM Tris/HCl pH 8; 300 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 5 mM β -ME
Elutionpuffer II	50 mM Tris/HCl pH 8; 300 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 250 mM Imidazol
Gelfiltrationspuffer	20 mM Hepes pH 8; 150 mM NaCl

hSirt3 (118-399)

Aufschlusspuffer	50 mM Tris/HCl 7,8; 200 mM NaCl
Waschpuffer 1	50 mM Tris/HCl 7,8; 500 mM NaCl
Waschpuffer 2	50 mM Tris/HCl 7,8; 200 mM NaCl; 5 mM Imidazol
Elutionpuffer	50 mM Tris/HCl 7,8; 200 mM NaCl; 250 mM Imidazol
HiTrap-Q-Puffer A	50 mM Tris/HCl 7,8; 50 mM NaCl
HiTrap-Q-Puffer B	50 mM Tris/HCl 7,8; 1M NaCl
Gelfiltrationspuffer	20 mM Tris/HCl 7,8; 150 mM NaCl

ME=Mercaptoethanol

Reinigung von humanem AROS

Das humane AROS-Protein wurde in *E. coli* exprimiert und aus dem unlöslichen Material renaturiert. Die Reinigung von AROS erfolgte nach dem Schema in Abbildung 1 unter Verwendung der Puffer in Tabelle 9.

Tabelle 9 Verwendete Puffer zur Reinigung von AROS.

Puffer	Zusammensetzung
Aufschlusspuffer I	100 mM Tris/HCl pH 7; 250 mM NaCl
Aufschlusspuffer II	50 mM Tris/HCl pH 7; 6 % (v/v) Triton; 1,5 M NaCl
Solubilisierungspuffer	100 mM Tris/HCl pH 7; 250 mM NaCl; 6 M GuHCl
Elutionspuffer I	100 mM Tris/HCl pH 7; 250 mM NaCl; 6 M GuHCl; 300 mM Imidazol
Dialysepuffer I	100 mM Tris/HCl pH 7; 250 mM NaCl; 4 M GuHCl
Renaturierungspuffer	100 mM Tris/HCl pH 7; 250 mM NaCl; 0,8 M L-Arginin; 5 % (v/v) Glycerin
Elutionpuffer II	100 mM Tris/HCl pH 7; 250 mM NaCl; 0,8 M L-Arginin; 5 % (v/v) Glycerin; 250 mM Imidazol
Dialysepuffer II	50 mM NaHPO ₄ pH 7; 300 mM NaCl; 150 mM L-Arginin
Gelfiltrationspuffer	50 mM NaHPO ₄ pH 7; 300 mM NaCl; 150 mM L-Arginin

Für den Zellaufschluss wurde der Aufschlusspuffer I verwendet. Die lysierten Zellen wurden mit 0,5 Vol. Aufschlusspuffer II für 30 Minuten auf Eis inkubiert und bei 31.000 x g für 10 min bei 4 °C (Avanti J-30I, JA3050-Rotor, Beckman, Krefeld) zentrifugiert.

Das Pellet wurde in Aufschlusspuffer I (5 mL/g Pellet) mittels Ultraschall (Branson Sonifier: mittlere Spitze, *Duty Cycle* 50 %, Stufe 5) resuspendiert und bei 31.000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt und das Pellet mit den Einschlusskörperchen von AROS konnte bei - 80 °C gelagert.

Die Solubilisierung erfolgte mit Guanidiniumchlorid. Dazu wurde 1 g des präparierten Pellets in 10 mL Solubilisierungspuffer gegeben und mittels Ultraschall (Branson Sonifier: mittlere Spitze, *Duty Cycle* 50 %, Stufe 5) für 2 Minuten unter Kühlung resuspendiert. Die Suspension wurde mit 50 µM PMSF und einer Proteaseinhibitor-Tablette (Roche) versetzt und für 2h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Um unlösliches Material abzutrennen, wurde die Lösung für 15 min bei 4.500 rpm und 20 °C (Zentrifuge 5804R, Eppendorf) zentrifugiert.

Mit dem Überstand erfolgte eine Affinitätschromatographie. Dazu wurden 10 ml Solubilisat mit 1 ml *beads* versetzt. Das Eluat wurde für 16 h gegen 1,8 L Dialysepuffer I dialysiert. Es folgte eine Pulsrenaturierung. Dazu wurde 1 L Renaturierungspuffer tropfenweise unter Rühren mit 50 mg AROS versetzt (erster Puls) und anschließend für zwei Stunden bei 4 °C inkubiert. Dieser Schritt wurde weitere zweimal wiederholt. Nach drei Pulsen wurden insgesamt 150 mg solubilisiertes AROS dem 1 L Renaturierungspuffer zugesetzt. Daraus ergab sich eine niedrige Proteinkonzentration (0,15 mg/L) und ein großes Volumen an Proteinlösung. Zur schonenden sowie effizienten Konzentrierung wurde eine Affinitätschromatographie ohne Waschschrift (1 ml *beads* zu 100 mL Renaturierungsansatz) durchgeführt. Die Elutionsfraktionen wurden 16 h gegen 4,5 L Dialysepuffer II dialysiert (MWCO: 12 -14 kDa) und für die darauffolgende SEC konzentriert.

2.4.12 Fluoreszenzbasierter Aktivitätsassay

Der Einfluss von AROS auf die Aktivität von Sirtuinen wurde unter Verwendung einer Fluoreszenzmessung mit dem p53-abgeleiteten Peptidsubstrat *Fluor-de-Lys 1* (FDL-1, zur Verfügung gestellt von Schutkowski, Halle) durchgeführt⁹⁶. Das Peptid setzt sich aus der Aminosäuresequenz RHKK sowie einer Acetylierung am zweiten Lysin

zusammen. Des Weiteren besitzt es eine C-terminale Cumarinmodifikation. 1,5 μM Sirtuin wurde mit 100 μM FdL-1 und 500 μM NAD^+ in 25 μL für 20 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 μL Entwicklerlösung (10 mg/ml Trypsin und 1 mM NAM) für 45 min bei 20 $^{\circ}\text{C}$ gestoppt und entwickelt. Die Deacetylierung des Peptidlysins durch das Sirtuin ermöglicht eine tryptische Abspaltung des Fluorophors Cumarin und resultiert daher nach Zugabe der Protease in einem Fluoreszenzsignal. Dieses wurde in einer Mikrotiterplatte der Firma Biozym (Hessisch Oldendorf) am FluoDiat70 Microplate Reader (Otsuka Electronics, Osaka, Japan) durch Anregung bei einer Wellenlänge von 365 nm und Emission bei einer Wellenlänge von 465 nm detektiert.

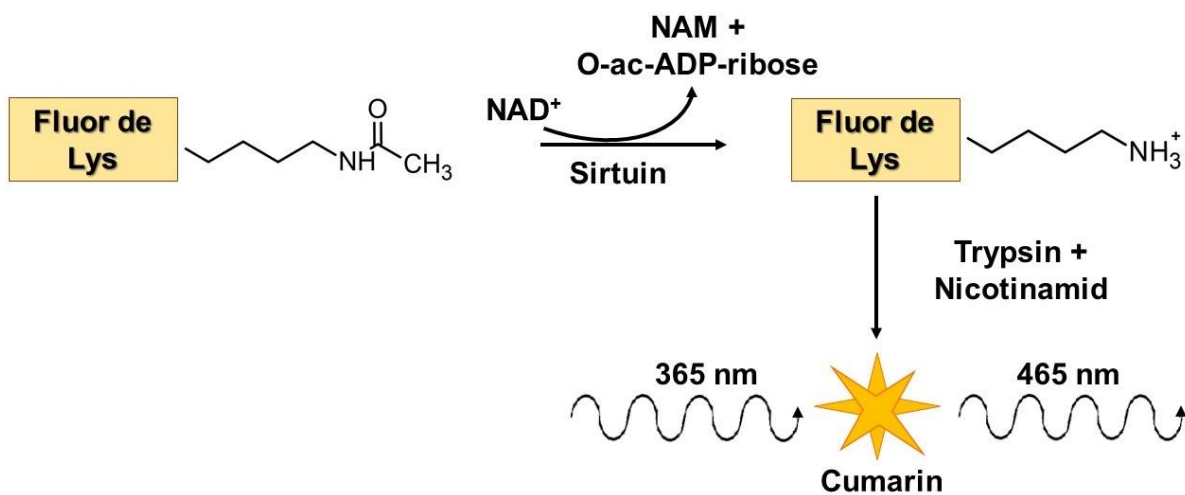


Abbildung 9 Fluor de Lys Deacylierungsassay zur Bestimmung der Sirtuinaktivität. Nachdem die Sirtuinreaktion mit Nicotinamid abgestoppt wurde, erfolgte die tryptische Abspaltung des deacetylierten FDL-Substrates und damit die Freisetzung des Fluorophors Cumarin.

2.4.13 Enzymgekoppelter Assay

Um die Sirtuinaktivität kontinuierlich über einen Zeitraum von 1h zu erfassen, wurde ein enzymgekoppelter Assay verwendet¹³³ (Abbildung 3). Dazu wurde das durch die Sirtuinreaktion gebildete Nicotinamid mit Hilfe einer Nicotinamidase aus *S. enterica* (laboreigene Herstellung) in Ammoniak und Nicotinsäure umgesetzt. Im nachfolgenden Schritt katalysiert Glutamatdehydrogenase (GDH) die Reaktion, bei der Glutamat durch die Übertragung des Ammoniaks auf α -Ketoglutarat gebildet wird. Dabei wird NADPH zu NADP^+ oxidiert. Je deacyliertem Peptid wird ein Ammoniakmolekül gebildet und somit ein NADPH-Molekül oxidiert. Da NADPH im

Gegensatz zur oxidierten Form bei einer Wellenlänge von 340 nm absorbiert, konnte die Aktivität durch die Abnahme bei dieser Wellenlänge bestimmt werden.

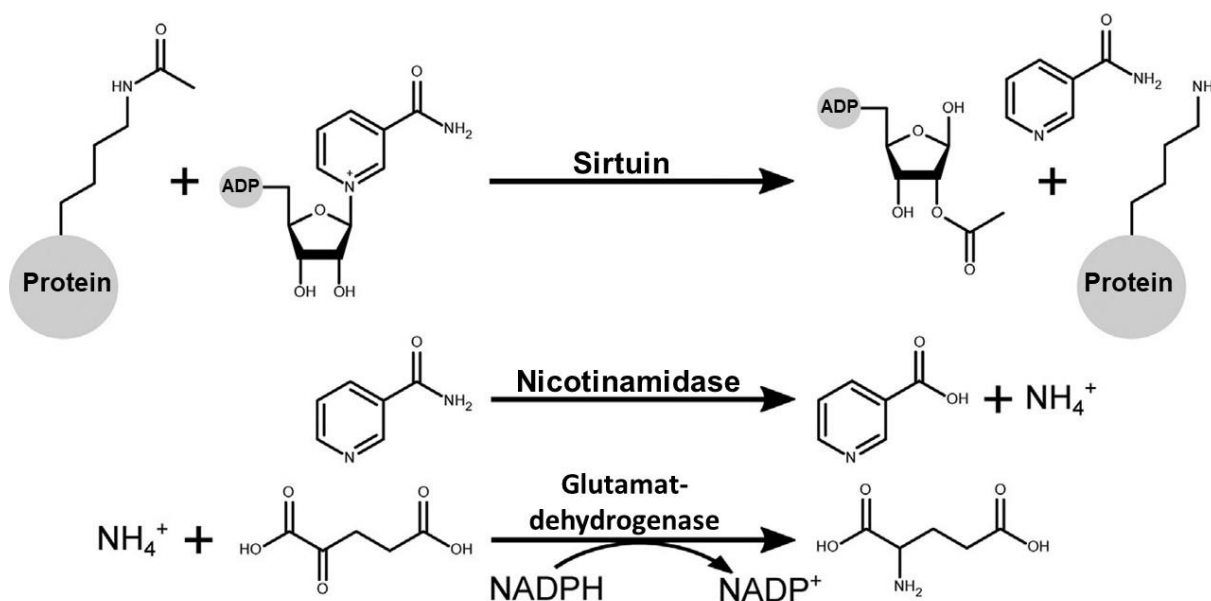


Abbildung 10 Ein kontinuierlicher, enzymgekoppelter Assay zur Bestimmung der Sirtuinaktivität¹³³. Das Produkt der Sirtuinreaktion Nicotinamid wird durch die Nicotinamidase (NCA) Nicotinamid zu Nicotinsäure und Ammoniak umgesetzt. Im nachfolgenden Schritt wird Ammoniak durch die Glutamatdehydrogenase (GDH) an α-Ketoglutarat gebunden und Glutamat gebildet. Dabei wird NADPH zu NADP⁺ oxidiert und die daraus resultierende Abnahme der Absorption kann bei 340 nm verfolgt werden.

Zur Durchführung der Reaktion wurden 20 µL 50 µM Substratpeptid in eine UV-STAR® 96-well Mikroplatte (Greiner Bio-one, Frickenhausen) vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 60 µM eines Mastermixes, der 0,4 µM Sirtuin, 1 mM NAD⁺, 2 mM DTT, 3,3 mM α-Ketoglutarat, 37,5 U/ml GDH, 2 µM Nicotinamidase und 0,5 mM NADPH enthielt, gestartet. Als Puffersystem wurden 50 mM NaHPO₄ mit pH 7 und 250 mM NaCl verwendet. Die Messung der Absorptionsabnahme erfolgte in einem LAMBDA-Scan-Spektrophotometer (MWG Biotech, Ebersberg). Anhand der Steigung des linearen Bereiches wurde die Deacetylaseaktivität berechnet. Der Einfluss von hAROS auf die Aktivität erfolgte durch Zugabe von hAROS zum vorgelegten Peptidsubstrat.

2.4.14 Mikroskalierbare Thermophorese

Um die Stärke der Interaktion von AROS mit Sirt1 zu ermitteln, wurde die Dissoziationskonstante (K_D) mit Hilfe von mikroskalierbarer Thermophorese (MST) bestimmt. Bei dieser Methode wird in einer Kapillare mittels Infrarot-Laser ein Temperatur-Gradient im Bereich von 2-6 K induziert. Die Fluoreszenzänderung des fluoreszenzmarkierten Proteins wird in Anwesenheit variierender Konzentration des Interaktionspartners aufgezeichnet. Zwei Effekte haben einen Einfluss auf die Fluoreszenzänderung. Zum einen zeigen Fluorophore eine temperaturabhängige Fluoreszenzänderung (*temperature related intensity change*, TRIC) und zum anderen bewegen sich Moleküle innerhalb eines Temperaturgradienten (Thermophorese). Durch Bindung mit einem Interaktionspartner ändert sich die chemische Umgebung des fluoreszenzmarkierten Proteins. Dies resultiert in einer bindungsabhängigen Fluoreszenzvariation bei Probenerwärmung und kann als K_D quantifiziert werden.

Für die MST-Messungen wurden entweder AROS oder Sirt1 zunächst mit einem Fluorophor markiert. Für die Kopplungsreaktion wurden 50 μM des jeweiligen Proteins mit 50 μM Cy5-NHS-Ester, welcher mit Lysinen an der Oberfläche des Proteins reagiert, für eine Stunde im Dunkeln in 50 mM Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 pH 8 bei RT inkubiert. Danach folgte die Entfernung von nicht-gebundenen Cy5 durch NAP5-Säule (GE Healthcare). Die Messung erfolgte in 50 mM Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 pH7,0, 250 mM NaCl und 2 mg/ml BSA, bei 20 °C sowie einer Absorptionswellenlänge von 630 nm und der Emissionswellenlänge 670 nm. Es wurde ein Monolith NT.115 (Nanotemper Technologies, LED-Leistung 50-70 %, Laserleistung 50-70 %) verwendet. Es wurden 40-120 nM fluoreszenzmarkiertes Protein verwendet. Die Messung (MO.Control) und Auswertung (MO.Affinity Analysis) erfolgte mit der Nanotemper Software.

2.4.15 Fluoreszenzbasiertes Denaturierungsexperiment (DSF)

Zur Messung thermischer Entfaltungskurven von Proteinen wurden der Fluoreszenzfarbstoff SYPRO (Sigma-Aldrich, Deisenhof) verwendet. Dieser emittiert ein Fluoreszenzsignal nach Bindung an hydrophoben und somit entfalteten Proteinbereichen. 12,5 μg Protein in 50 μl Puffer wurden mit 1 μl SYPRO versetzt, in eine 96-well Mikrotiterplatte (Biozym, Hessisch Oldendorf) überführt und anschließend mit 15 μl Mineralöl überschichtet. Die Messung erfolgte mit einem *FluoDiaT70 fluorescence plate reader* (Otsuka Electronics, Osaka, Japan). Dabei wurde die

Temperatur schrittweise um 1 °C erhöht. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 465 nm und die Emission wurde bei 580 nm detektiert.

2.4.16 Circular dichroismus

CD-Spektren von 10 µM AROS wurden in 10 mM NaHPO₄ pH 7 mit einem Jasco J-715 CD-Spektrometer (JASCO, Pfungstadt) bei 20 °C in einer 1 mm Quarzküvette und einem Probenvolumen von 200 µl aufgenommen. Das Signal wurde in dem Wellenlängenbereich von 250 bis 195 nm, bei einer Aufnahmegeschwindigkeit von 50 nm/min sowie zehn Akkumulationen detektiert. Die aufgenommenen CD-Spektren mittels eines Savitzki-Golay-Filters geglättet und nach Gleichung 2 normiert.

$$\theta_{MRW} \left[\frac{deg \cdot cm^2}{dmol} \right] = \frac{100 \cdot \theta [mdeg]}{N \cdot c [mM] \cdot d [cm]} \quad \text{Gleichung 2}$$

θ_{MRW} = mittlere Elliptizität pro Aminosäurerest

θ = Elliptizität

N = Anzahl der Aminosäuren

d = Schichtdicke der Quarzküvette

c = Proteinkonzentration

Der Anteil der Sekundärstrukturelemente wurde mit Hilfe des Programms BESTSEL¹³⁴ kalkuliert.

2.4.17 Detektion zugänglicher Sulfhydrylgruppen

Zugängliche Sulfhydrylgruppen wurden kolorimetrisch unter Verwendung des Ellman-Reagenz 5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzonsäure (DTNB) detektiert. Dazu wurden 1-5 µl Proteinlösung mit Detektionslösung (0,1 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,1 mM DTNB, 2,5 mM Na-Acetat) auf 100 µl aufgefüllt, bei Raumtemperatur 10 min inkubiert und die Absorption bei 412 nm mit einem Biomate 3-Photometer (Thermo Fisher, Waltham, USA) bestimmt. Die Sulfhydrylkonzentration wurde dann nach dem Lambert-Beer-Gesetz (Gleichung 1) mit einem Extinktionskoeffizienten von 212 M⁻¹ cm⁻¹ berechnet.

2.4.18 Protein-Protein Quervernetzung

Die chemische Quervernetzung von Proteinen erfolgte in 50 mM NaHPO₄ pH 7 und 250 mM NaCl bei einer Proteinkonzentration von je 50 µM. Alle Proben wurden zunächst in dieses Puffersystem mit *Xpress Micro Dialyzer* (MWCO: 6 kDa, Serva, Heidelberg) dialysiert. Zur Quervernetzung der Proteine wurden die homofunktionellen *Crosslinker* Disuccinimidylsulfoxid (DSSO) und Glutaraldehyd verwendet. Diese verbinden Lysine miteinander. Die Reaktion erfolgte mit 2 mM DSSO oder 0,22 mM Glutaraldehyd bei RT. Es wurden 1/10 Volumen des Reaktionsansatzes nach verschiedenen Zeitpunkten entnommen und durch Zugabe 1/2 Volumen der Stopplösung (1 M Tris/HCl pH 8) gestoppt. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer (50 mM Tris/HCl pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 100 mM β-Mercaptoethanol, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt, für 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht und mittels SDS-PAGE analysiert.

2.4.19 Massenspektrometrie

Zur Analyse quervernetzter Proteinproben mittels Massenspektrometrie (MS) wurde eine proteolytische Spaltung mit Trypsin durchgeführt. Dazu wurden die Banden der Proteinkomplexe aus der SDS-PAGE ausgeschnitten, zerkleinert und in einem Eppendorfreaktionsgefäß mit 100 µl 50 % (v/v) Methanol überschichtet. Nach einigen Sekunden wurde das Methanol verworfen und die Gelstücke wurden mit 100 µl einer Entfärbelösung (50 mM NH₄HCO₃, 50 % Acetonitril (ACN)) bei 37 °C (1000 U/min, Thermomixer *compact*, Eppendorf, Hamburg) inkubiert, bis sie vollständig klar waren. Die Entfärbelösung wurde alle 15 Minuten gewechselt. Anschließend wurden die Gelstücke in einer Vakuumzentrifuge (max. U/min, 55 °C, BA-VC-300H, H. Saur Laborbedarf, Reutlingen) vollständig getrocknet, mit 50 µl 25 mM DTT in 25 mM NH₄HCO₃ pH 8,5 gelöst und für 20 min bei RT reduziert. Danach wurde der Überstand entfernt und die Proben mit 50 µl 55 mM Iodacetamid (IAA) in 25 mM NH₄HCO₃ und pH 8,5 für 20 min bei RT im Dunkeln alkyliert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Gelstücke für 0,5 min mit 1 mL ddH₂O gewaschen und mit 200 µl 25 mM NH₄HCO₃ pH 8,5 und 50 % (v/v) ACN für 15 min sowie mit 100 µl 100 % ACN für 5 min dehydriert und erneut in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Nach Zugabe von 10 µl von 12,5 ng/µl Trypsin-ultra™ (NEB) in 25 mM NH₄HCO₃ pH 8,0 für 10 min bei RT rehydriert. Die Gelstücke wurden anschließend mit 25 mM NH₄HCO₃ pH 8,5 überschichtet. Nach einer Inkubation von ca. 16 h bei 37 °C wurde der Überstand

gewonnen und separat gelagert. Die im Gel verbliebenen Peptide wurden durch Zugabe von 50 % (v/v) ACN sowie 0,5 % (v/v) TFA und anschließendem Sonifizieren (Ultraschallreiniger USC 300TH, VWR) für 20 min bei RT extrahiert. Der dabei gewonnene Überstand wurde mit dem Überstand der Trypsin-Spaltung zusammengeführt und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Peptide wurden vor der MS-Analyse in 20 µl 0,1 % (v/v) Formaldehyd (FA) gelöst.

Zur Analyse der Proben wurde eine Flüssigchromatographie (*liquid chromatographie*, LC) mit anschließender Elektrosprayionisation (*electrospray ionization*, ESI) und Tandem Massenspektrometrie (MS/MS), die LC-ESI-MS/MS verwendet. Die Messung erfolgte mit einem LTQ-XL-Massenspektrometer (Thermo Scientific, Braunschweig) und einem Probenvolumen von 5 µL (2 pmol). Die Peptidtrennung erfolgte mit dem Flüssigchromatographiesystem EASY-nLC II (Thermo Scientific, Braunschweig) und einem linearen Gradienten von 100 % Lösungsmittel A (5 % ACN, 0,1 % Ameisensäure) zu 35 % Lösungsmittel B (95 % ACN, 0,1 % Ameisensäure) über 30 min und von 35 % zu 100 % Lösungsmittel B in 5 min bei einer konstanten Flussrate von 0,4 µL/min. Das LC-System war an einem 15 cm langem Emitter aus Quarzglas (New Objective, Littleton, USA) mit einem Innendurchmesser von 75 µm angeschlossen. Dieser wurde laborintern mit ReproSil-Pur C18-AQ 3 µm Perlen (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch) gepackt. Die Datenaufnahme erfolgte, indem ein MS-Scan, gefolgt von drei MS/MS-Scans der drei intensivsten Ionen des ersten MS-Scans erfasst wurden. Die MS/MS-Spektren wurden auf einen Scan pro Vorläuferion begrenzt, gefolgt von 0,5 min Ausschluss. Die Datenbanksuche erfolgte mit der Byonic-Software (Protein Metrics, Cupertino, USA).

2.5 Bioinformatische Sequenzanalyse

Die Aminosäuresequenz des humanem AROS-Proteins stammte von der UniProt-Datenbank¹³⁵ mit dem Eintrag Q86WX3. Für die Kalkulierung des Molekulargewichts sowie des isoelektrischen Punktes eines Proteins wurde *ProtParam*¹³⁰ verwendet. Die Vorhersage über die Strukturiertheit sowie den Sekundärstrukturanteil von AROS erfolgte mit der Software DISOPRED¹³⁶ und PONDR^{®137}. Für die Vorhersage der Tertiärstruktur von AROS wurde das Programm RaptorX¹³⁸ verwendet.

2.6 Strukturbioologische Methoden

2.6.1 Kristallografie

2.6.1.1 Kristallisation

Kristallisationsexperimente wurden im Dampfdiffusionsverfahren durchgeführt. Geeignete Kristallisationslösungen wurden nach dem *incomplete factorial* Ansatz¹³⁹ mit kommerziell erhältlichen faktoriellen *Screens* der Firmen Qiagen (JCSG Core I - IV, JCSG+), Molecular Dimensions (PACT Premier Screen) und einem definierten PEG *Smear Screen*¹⁴⁰ (laborinterne Herstellung) ermittelt. Hierbei wurden sitzenden Tropfen mit Hilfe eines Phoenix-Roboters (Art Robbins Instruments, Sunnyvale, USA) pipettiert. Dazu wurden MRC2- bzw. MRC3-Platten (Hampton Research, Aliso Viejo, USA) verwendet. Die Reservoirlösung betrug 35 µL und die Tropfen bestanden aus je 0,2 µL Proteinlösung sowie Reservoirlösung. Proteinlösungen wurden zuvor bei 15.000 x g für 10 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg). Die Platten wurden anschließend luftdicht mit Crystal Clear Klebeband (Hampton Research, Aliso Viejo, USA) verschlossen und bei 4 bzw. 20 °C gelagert. Die Lagerung bei 20 °C erfolgte in einem Imaging-System (Rock Imager 1000, Formulatrix, Bedford, USA), die eine automatische Bilddokumentation mit der Software Rock Maker (Formulatrix, Bedford, USA) ermöglichte. Die Optimierung geeigneter Kristallisationsbedingungen erfolgte durch systematische Variation der Präzipitationskonzentration in einer Dimension und des pH-Wertes in der zweiten Dimension. Dabei wurden vorgefettete VDX Kristallisationsplatten (Hampton Research, Aliso Viejo, USA) mit hängenden Tropfen verwendet. Das Reservoirvolumen betrug 500 µL und der Tropfen bestand aus je 1 µL Protein- und Reservoirlösung. Zur Herstellung einer *Microseeding*-Lösung wurde der Tropfen mit initialen Kristallen in 20 µL Reservoirlösung überführt, mit Glaskügelchen (Hampton Research, Aliso Viejo, USA) gevortext und anschließend verdünnt (z.B. 1:100, 1:1000 und 1:10.000). 0,2 µL dieser Verdünnungen wurden zu den Tropfen neuer Kristallisationsansätze pipettiert. Die genauen Kristallisationsbedingungen, welche zu Komplexstrukturen führten, sind nachfolgend aufgeführt.

Kristallisation von Sirt2/ADP-Ribose/Quercetin

Die Kristallisation von Sirt2 mit ADP-Ribose (ADPr) erfolgte bei 20 °C mit 14 % Polyethylenglycol (PEG) 10.000, 0,1 M Ammoniumacetat und 0,1 M Bis-Tris pH 5.8 als Reservoirlösung^{141,142}. Die Konzentration von Sirt2 betrug 13 mg/mL und von ADPr 20 mM. Die Sirt2/ADPr-Kristalle erschienen nach 2 bis 3 Tagen und wurden anschließend mit 40 mM Quercetin für 3 Tage inkubiert. Einzelne Kristalle wurden mit einem *Cryo-Loop* (Hampton Research, Aliso Viejo, USA) gefischt, in einem Cryoprotektanz bestehend aus Reservoirlösung, 10 mM Quercetin, 2 mM ADPr und 20 % Glycerin gewaschen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Kristallisation von Sirt3/Fragmentkomplexen

Initiale Kristalle von Sirt3 wurden mit dem Präzipitant MMW (*medium molecular weight*) des PEG-*Smear Screens* erhalten. Dabei handelt es sich um eine Kombination aus verschiedenen PEG-Verbindungen (PEG 2000, 3350, 4000 and Polyethylenglycol-Methylether 5000) mit mittleren Molekulargewichten im Verhältnis 1:1. Die optimierte Kristallisation von Sirt3 erfolgte bei 20 °C mit 12 % MMW, 0,1 M Natriumkakodylat-3-hydrat pH 6,6 und 0,2 M Lithiumsulfat-1-hydrat. Dem Ansatz wurden Kristalltrümmer aus einer 1:50.000 Verdünnung der Seeding-Lösung zugesetzt. Diese wurde aus Kristallen, welche bei höheren Präzipitantenkonzentration (20 % MMW, 0,1 M Natriumkakodylat-3-hydrat pH 6,6 und 0,2 M Lithiumsulfat-1-hydrat) entstanden, hergestellt. Das kristallografische-Screening nach neuen Sirt3-Liganden erfolgte mit einer Fragment-Bibliothek, bestehend aus 96 Verbindungen, welche vom Helmholtz Zentrum Berlin zur Verfügung gestellt wurde¹⁴³. Die Verbindungen wurden als Feststoff auf 3 *Well Crystallization Plate Low Profile-UVP* (Jena Bioscience, Jena) angebracht. Die Tränkungsbedingung bestand aus 20 % MMW, 0,1 M Natriumkakodylat-3-hydrat pH 6,6 0,2 M Lithiumsulfat-1-hydrat, 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) und 100 mM Fragment. Sie diente gleichzeitig der Cryoprotektanz. Je Fragment wurden zwei Kristalle in 2 µL der Tränkungslösung übertragen, für 24 h inkubiert, anschließend mit einem *Cryo-Loop* (Hampton Research, Aliso Viejo, USA) gefischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Kristallisation von Sirt3/AROS-Peptide

10 mg Sirt3 wurden mit 1 mM AROS-Peptid 62-71 und 1 mM AROS-Peptid 96-109 für 16 h bei 20 °C inkubiert und anschließend bei 15.000 x g für 10 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge 5415R, Eppendorf). Initiale Kristalle, welche in der Bedingung 12 % PEG 8.000, 0,1 M HEPES pH 7,5 und 0,2 M NaCl des *Protein Complex Suite screens* (Quiagen, Hilden) wuchsen, wurden in Cryoprotektanz bestehend aus Reservoirolösung versetzt mit 25 % (v/v) Glycerin und 1 mM der AROS-Peptide gewaschen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.6.1.2 Datensammlung

Um die Diffraktionsqualität von Kristallen am Lehrstuhl zu testen, wurde ein mar μ X-Röntgenstrahlungssystem (MarResearch, Norderstedt) verwendet. Die Messung erfolgte mit einer monochromatischen CuK α -Strahlung und einer Wellenlänge von 1,5418 Å bei 100 K. Die Distanz zum Detektor betrug 200 mm, die Belichtungszeit 10 min und der Drehwinkel ein Grad pro Beugungsbild. Datensätze wurden am BESSY II-Elektronenspeicherring (Helmholtz-Zentrum Berlin, Berlin-Adlershof) an der Beamline 14.1 (Pilatus 6M-Detektor) bzw. 14.2 (Pilatus 2M-Detektor) bei 100 K aufgenommen. Als Strahlungsquelle diente ein supraleitender 7 Tesla Wellenlängenschieber¹⁴⁴ und die Wellenlänge betrug 0,91841 Å. Die Detektordistanz wurde entsprechend der Beugungsqualität des Kristalls eingestellt. Dazu wurde ein Beugungstest mit zwei Bildern mit einer Belichtungszeit von 0,5 sec durchgeführt. Der Drehwinkel je Beugungsbild betrug ein Grad. Nach dem ersten Bild wurde der Kristall um 89 ° gedreht. Anschließend wurde die Strategie für die Datensatzsammlung mit imosflm¹⁴⁵ evaluiert. Die Datensätze wurden mit einem Drehwinkel von 0,1 ° und einer Belichtungszeit von 0,2-0,5 s pro Bild (ca. 2000) aufgenommen.

2.6.1.3 Datenprozessierung, Modellbau und Darstellung

Die Prozessierung der Daten erfolgte mit der *XDSAPP 2.0*¹⁴⁶. Der L-Test von POINTLESS zeigte, dass die Sirt2/Quercetin-Kristalle verzwilligt waren¹⁴⁷. Die Phasierung erfolgte durch molekularen Ersatz mit Phaser aus der CCP4-Software¹⁴⁸ mit der Sirt2/1,2,4-Oxadiazol/ADPr-Struktur (Pdb-Eintrag: 5MAR¹⁴²) als Suchmodell. Die Phasierung der Sirt3/Fragment- sowie Sirt3/AROS-Strukturen erfolgte mit den Sirt3 Pdb-Einträgen 5D7N¹⁴¹ (Sirt3-Fragment-Strukturen) und 3GLS⁵⁵ (Sirt3/AROS-Struktur) als Suchmodell und dem Programm *Phaser* der Phenix Plattform¹⁴⁸. Ein Sirt3

Molekül wurde sechsmal in der assaymetrischen Einheit gesucht. Die Strukturen wurden manuell in COOT¹⁴⁹ nachgebaut und mit Refmac¹⁵⁰ verfeinert. Die Verfeinerungen von Sirt2 erfolgten mit der amplitudenbasierten Zwillingsverfeinerung und ergaben Zwillingsanteile von 22%. Strukturabbildungen wurden mit PyMOL (Schrödinger, LLC; <https://pymol.org/2/>) erstellt.

2.6.2 NMR

2.6.2.1 Datensammlung und -prozessierung

Die NMR-Messungen wurden an einem Bruker Avance-Spektrometer (Bruker Avance 700 bzw. 1000, Bruker, Billerica, USA) bei einer Protonenresonanzfrequenz von 700 bzw. 1000 MHz durchgeführt. Zuordnungsexperimente wurden an einem Bruker Avance 700 durchgeführt. Die Aufnahmen der Interaktionsexperimente mit Sirtuinen erfolgten an einem Bruker Avance 1000-Spektrometer. Hierzu wurde ein cryogen gekühlter inverser $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Tripleresonanzprobenkopf mit abgeschirmten Gradienten für die z-Achse genutzt. Die Datensätze wurden mit Skripten des Lehrstuhls Biopolymere der Universität Bayreuth prozessiert und mittels des Programms NMRViewJ (Version xxx, One Moon Scientific, Westfield, USA) visualisiert und ausgewertet.

2.6.2.2 Zuordnungsexperimente

Zur Rückgratzuordnung von hAROS wurden die in Tabelle 10 aufgeführten Experimente durchgeführt. Für die [^1H , ^{15}N] *heteronuclear single quantum coherence* (HSQC)-Experimente wurden 100 μM ^{15}N -markiertes hAROS in 50 mM NaHPO_4 pH 6,5, 300 mM NaCl, 150 mM L-Arginin und 10 % (v/v) D_2O verwendet. Alle anderen Experimente wurden mit 300 μM ^{15}N - ^{13}C -markiertem hAROS in dem Puffer 50 mM NaHPO_4 pH 6,5, 300 mM NaCl, 150 mM L-Arg und 10 % (v/v) D_2O durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei 5 °C in einem 3 mm NMR-Probenröhrchen (Ultra Precision-NMR-Probenröhrchen, Norell, Morganton, USA).

Tabelle 10 Durchgeführte Experimente zur Rückratzuordnung von hAROS.

Experiment	Dimension	Kern	SW ^a (Hz)	TD ^b	Referenz
¹ H, ¹⁵ N]-HSQC	F2	¹ H	9803,92	1370	Mori <i>et al.</i> , 1995 ¹⁵¹
	F1	¹⁵ N	1561,04	384	
CBCA(CO)NH / HN(CO)CACB	F3	¹ H	9803,92	1370	Grzesiek <i>et al.</i> , 1992 ¹⁵²
	F2	¹³ C	11441,65	128	
	F1	¹⁵ N	1561,04	76	
CC(CO)NH	F3	¹ H	9803,92	1024128	Grzesiek <i>et al.</i> , 1993 ¹⁵³
	F2	¹³ C	12315,271561,04	76	
	F1	¹⁵ N			
HNCA	F3	¹ H	9803,92	137096	Kay <i>et al.</i> , 1990 ¹⁵⁴
	F2	¹³ C	5285,41	76	
	F1	¹⁵ N	1561,04		
HNCACB	F3	¹ H	9803,92	1370128	Grzesiek <i>et al.</i> , 1992 ¹⁵⁵
	F2	¹³ C	11441,651561,04	76	
	F1	¹⁵ N			

a: Spektrales Fenster (*sweep width*, SW); b: Zahl der realen Datenpunkte (*time domain*, TD)

2.6.2.3 Interaktionsexperimente

Die Interaktionsuntersuchungen erfolgten mittels 2D-[¹H,¹⁵N]-HSQC-Experimenten. Dazu wurden 100 µM ¹⁵N-markiertes hAROS in 50 mM NaHPO₄ pH 6,5, 300 mM NaCl, 150 mM L-Arginin und 10 % (v/v) D₂O mit 100 µM Sirtuin gemischt und anschließend gemessen. Die Messungen erfolgten bei 20 °C in einem 3 mm NMR-Probenröhrchen (Ultra Precision-NMR-Probenröhrchen, Norell, Morganton, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Regulation von Sirtuinen durch Quercetin

Die regulatorische Wirkung des antidiabetischen und entzündungshemmenden, pflanzlichen Flavonoids Quercetin¹⁵⁶ auf die Aktivität von Sirtuinen wurde innerhalb der Arbeitsgruppe mit Sirt6 charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass Quercetin die Deacetylaseaktivität von Sirt6 aktiviert¹⁰⁴. Hingegen konnte für die anderen Isoformen ein inhibitorischer Effekt nachgewiesen werden. Um die strukturellen Grundlagen für die isoformspezifische Sirtuin-Inhibition durch Quercetin zu untersuchen, sollte die Kristallstruktur eines Sirt2/Quercetin-Komplexes gelöst werden. Dazu wurde eine für Tränkungsexperimente geeignete Kristallisationsbedingung von Sirt2 verwendet. Diese führte bereits zur Strukturlösung verschiedener Sirt2/Inhibitor-Komplexe^{141,142}.

Zunächst erfolgte die Kristallisation von Sirt2 in Komplex mit dem Cosubstrat ADP-Ribose. Die Überführung der Sirt2-Kristalle in einen Tropfen der gleichen Kristallisationsbedingung mit Quercetin, resultierte in einer Gelbfärbung der Kristalle (Abbildung 11A), was ein Hinweis auf die Anwesenheit des gelben Flavonoids Quercetin ist. Mit diesen Kristallen konnte eine Struktur des Sirt2/Quercetin-Komplexes mit einer Auflösung von 2,2 Å gelöst werden (Abbildung 11B, Tabelle 11). Die gut definierte Elektronendichte des Quercetins zeigt die Bindung des Moleküls am Eingang des aktiven Zentrums von Sirt2 (Abbildung 11 B-E). Die Interaktion des Quercetins mit dem Sirtuin erfolgt über π - π -Wechselwirkungen des Tyrosin 114 mit dem Chromen-4-on-System des Quercetins und des Phenylalanin 235 mit dem Catechol-Anteil des Quercetins. Des Weiteren finden Anion- π -Wechselwirkungen zwischen der Glutaminsäuren 116 und dem Chromen-4-on-System sowie zwischen der Glutaminsäuren 120 und dem Catechol-Anteil statt. Das Quercetin befindet sich zwischen den zwei Sirt2-Monomeren der asymmetrischen Einheit (Abbildung 11 C). Dabei erfolgt die Interaktion des Flavonoids jeweils mit der gleichen Region der beiden Monomere. Allerdings findet die Interaktion von Quercetin mit dem zweiten Monomer in einer anderen Orientierung sowie mit weniger Kontakten statt, sodass der Bindungsmodus mit dem ersten Monomer in Lösung wahrscheinlicher ist. Für eine genauere Analyse des Inhibitionsmechanismus erfolgte eine Überlagerung des Sirt2/Quercetin-Komplexes mit einem Sirt2/Substratpeptid-Komplex. Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, wird die Bindungstasche C-terminal von dem acylierten Lysin des

Peptidsubstrates teilweise von Quercetin besetzt. In der Folge kommt es zu einer sterischen Hinderung der Substratbindung. Dieser Peptidkompetitions-mechanismus wird durch *in vitro*-Daten unterstützt. So konnte bei steigenden Substratkonzentrationen eine Schwächung der inhibitorischen Wirkung bei gleicher InhibitorKonzentration beobachtet werden¹⁵⁷.

Tabelle 11 Aufnahme der Diffraktionsdaten des Sirt2/Quercetin-Komplexes sowie Statistik der Verfeinerung des Modells.

Datensammlung		
Raumgruppe		P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellkonstanten (Å)		a=b=78,2 c=114,5
Auflösung (Å) ^a		46,22-2,23 (2,37-2,23)
R _{merge} ^a		0,28 (1,90)
CC _{1/2} (Å) ^a		97,6 (28,2)
Intensität über Sigma (I) ^a		4,4 (0,7)
Vollständigkeit (%) ^a		99,5 (97,1)
Redundanz ^a		7,4 (7,4)
Verfeinerung		
Auflösungsbereich (Å)		46,22-2,23 (2,29-2,23)
Gemessene Reflexe		32823
R-Faktor / Rfree-Faktor (%)		21,1/23,0
Twin law ^b		-k, -h, -l
Twin fractions ^b		0,78/0,22
Anzahl der Atome	Protein	4735
	Quercetin	22
	ADP-Ribose	72
	Wasser	28
B-Faktoren (Å ²)	Protein	53,9
	Quercetin	67,3
	ADP-Ribose	34,8
	Wasser	46,4
R.m.s. Abweichungen von Idealwerten	Bindungslängen (Å)	0,014
	Bindungswinkel (°)	2,2

a: Werte der äußersten Schale. b: Twinning wurde mit dem L-Test von CCP4 POINTLESS festgestellt. Die twin-Fraktionen wurden während der amplitudenbasierten twin-Verfeinerung mit Refmac ermittelt.

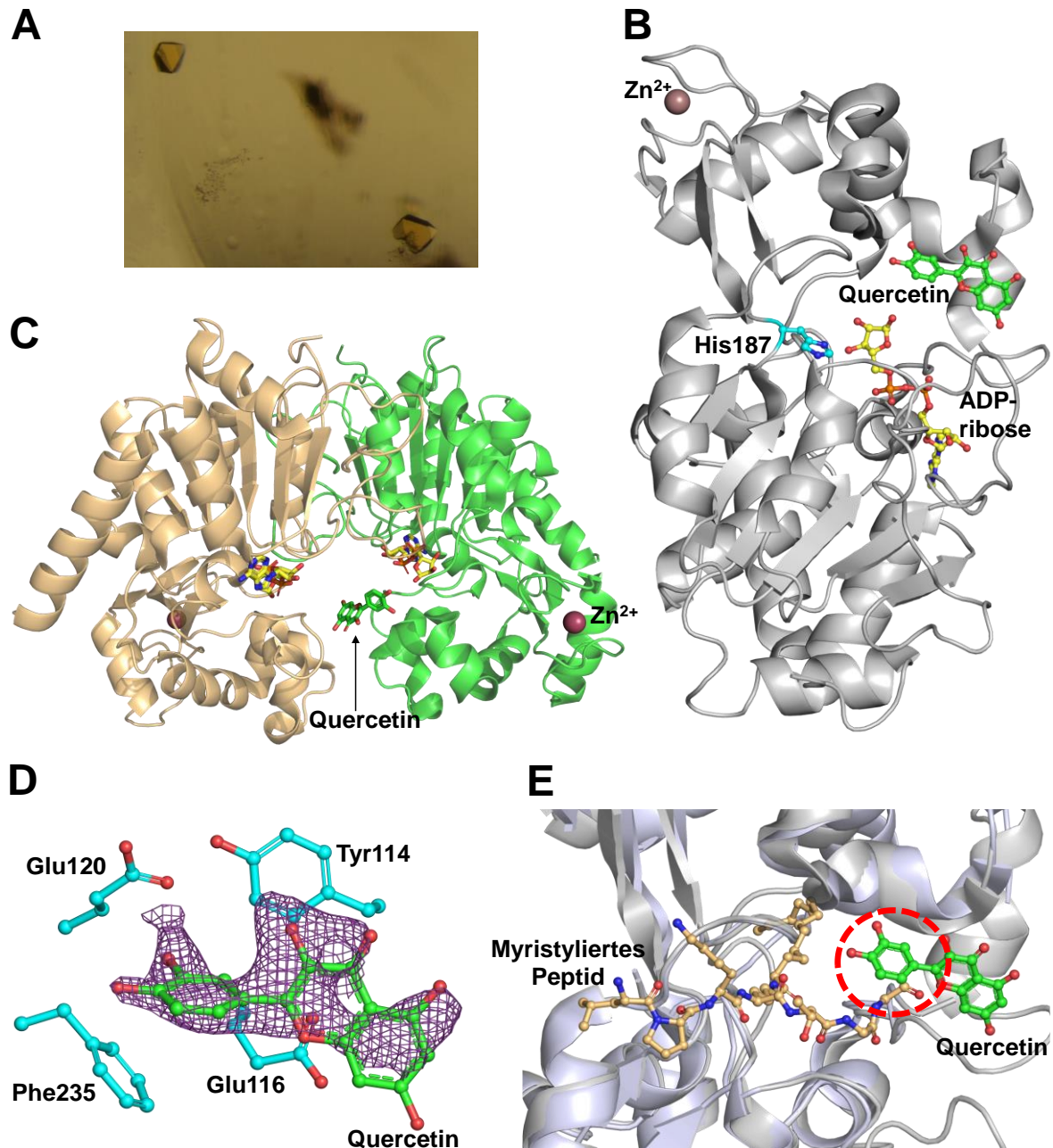


Abbildung 11 Struktur des Sirt2/Quercetin-Komplexes zeigt sterische Hinderung der Peptidsubstratbindung durch Bindung von Quercetin. (A) Gelbfärbung der Proteinkristalle von Sirt2 in Komplex mit ADP-Ribose nach dreitägigem Tränken mit Quercetin. (B) Kristallstruktur von Sirt2 in Cartoon-Darstellung als Komplex mit ADPr (Gelb) und Quercetin (Grün). Das katalytische Histidin (Cyan), ADPr und Quercetin werden als Stäbchen und die Elemente Stickstoff, Sauerstoff und Phosphor in Blau, Rot bzw. Orange dargestellt. (C) Symmetrieverwandte Monomere (Hellorange/ Grün) in Cartoon-Darstellung. (D) Vergrößerte Ansicht des Quercetins (Grün) mit der überlagerten $2F_o - F_c$ -Elektronendichte konturiert bei $1,0 \sigma$ (Lila) und den beschrifteten, interagierenden Seitenketten (Cyan). (E) Überlagerung des Sirt2/Quercetin-Komplexes (pdb-Eintrag: 6QCN¹⁵⁷, Grau) mit einem Sirt2/myristyliertem Substratpeptid-Komplex (pdb-Eintrag: 4Y6O¹⁵⁸ in Cartoon-Darstellung in Hellblau; myristyliertes Substratpeptid als Stäbchen in Hellorange). Gestrichelter Kreis zeigt sterische Hinderung zwischen Quercetin und C-terminalem Bereich des Peptidsubstrates.

3.2 Screening von Ligandenfragmenten gegen Sirt3

Sirt3 ist die einzige mitochondriale Isoform mit einer robusten Deacetylaseaktivität und wird als vielversprechendes Ziel zur Behandlung von altersbedingten und metabolischen Erkrankungen betrachtet. Aufgrund dessen besitzt die pharmakologische Sirt3-Aktivierung mit Kleinmolekülen therapeutisches Potenzial. Dennoch gibt es keine potenten Sirt3-Aktivatoren und die strukturellen Grundlagen des Aktivierungsmechanismus bleiben ungeklärt. Es gibt daher einen großen Bedarf an kristallografischen Strukturen, welche zum Verständnis und zur Entwicklung potenter Sirt3-Aktivatoren beitragen können.

Eine geeignete Methode dafür ist das kristallografische *screening* mit Hilfe einer Fragment-Bibliothek. Voraussetzungen zur Durchführung ist zum einen die reproduzierbare Herstellung einer großen Anzahl an hochauflösender Proteinkristallen (>100) und zum anderen stabile Cryoprotektanz- und Tränkungsbedingungen. Um dies zu gewährleisten, wurde zunächst nach einer geeigneten Kristallisationsbedingung gesucht. Die Verwendung einer Mischung verschiedener PEG-Moleküle als Präzipitationsreagenz zeigte eine starke Kristallbildung von Sirt3 innerhalb weniger Minuten (Abbildung 12A). Durch Reduzierung der Konzentration des Präzipitationsreagenz sowie den Einsatz von Kristallbruchteilen zur Keimbildung konnte das Kristallisationsverhalten optimiert und die entsprechende Anzahl stabiler, hochauflösender (ca. 2 Å) Kristalle hergestellt werden (Abbildung 12B).

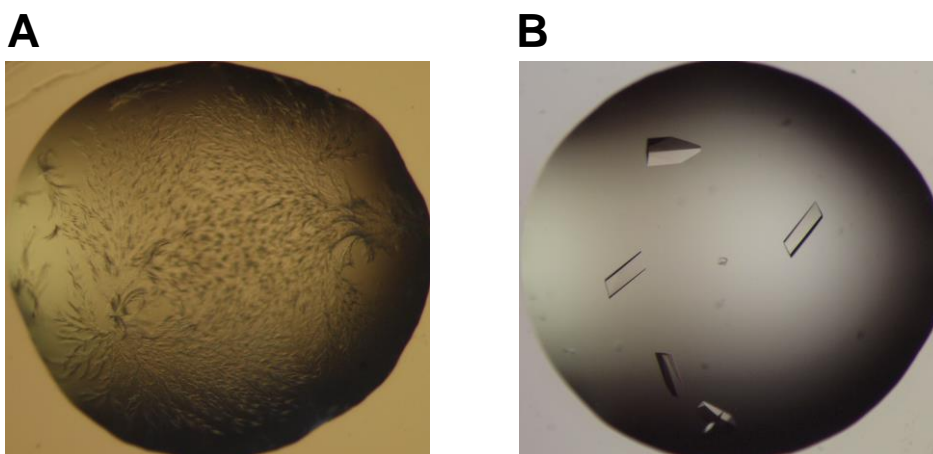


Abbildung 12 Kristallisationsoptimierung von Sirt3. (A) Sirt3 kristallisiert in 22,5 % MMW (*medium molecular weight*, PEG-Verbindungen mit mittleren Molekulargewichten, 0,1 M Natriumkakodylat-3-hydrat pH 5,5 und 0,2 M Lithiumsulfat-1-hydrat. (B) Verbesserte Sirt3-Kristalle kristallisiert in 12 % MMW, 0,1 M Natriumkakodylat-3-hydrat pH 6,6 und 0,2 M Lithiumsulfat-1-hydrat und unter Verwendung von Kristallbruchteilen zur Keimbildung.

Diffraaktionsdaten dieser Kristalle wurden mittels molekularen Ersatzes (pdb-Eintrag 5D7N¹⁴¹) phasiert und die Strukturen gelöst. Sirt3 kristallisierte in der Raumgruppe P2₁ mit sechs Monomeren in der asymmetrischen Einheit. Alle Monomere weisen die typische Sirtuinstruktur mit der Rossmann-Domäne und der zinkbindenden Domäne auf und befinden sich in der offenen Konformation. Die Monomere zeigen geringe Unterschiede innerhalb der asymmetrischen Einheit (r.m.s.d. zwischen 0,3 und 0,8 Å für alle C^α-Atome). Wie bei bereits publizierten Röntgenstrukturen von Apo-Sirt3 befindet sich ein PEG-Molekül in der Acyllysine-Bindungsstelle^{141,159,160}.

Die verwendete Bibliothek resultierte in zwei Sirt3-Strukturen, in denen Fragmente gebunden sind (Abbildung 13A, Tabelle 12). Hierbei handelt es sich um Azaxanthin und Barbitursäure.

Tabelle 12 Aufnahme der Diffraaktionsdaten der Sirt3/Fragment-Komplexe sowie Statistik der verfeinerten Modelle.

	Sirt3/ Barbitursäure	Sirt3/ Azaxanthin
Datensammlung		
Raumgruppe	P2 ₁	P2 ₁
Zellkonstanten	a=85,9 (Å) b=142,4 (Å) c=95,7(Å) α=γ=90 ° β=115,5 °	a=85,7(Å) b=142,4 (Å) c=95,4 (Å) α=γ=90 ° β=115,5 °
Auflösung (Å) ^a	42,94-2,36 (2,44-2,36)	48,17-2,06 (2,13-2,06)
R _{merge} ^a	0,065 (0,857)	0,112 (2,436)
CC _{1/2} (%) ^a	99,8 (66,2)	99,7 (17,8)
Intensität über Sigma (I) ^a	13 (1,5)	7,6 (0,4)
Vollständigkeit (%) ^a	98,8 (97,1)	98,7 (99)
Redundanz ^a	3,9 (4)	3,9 (3,9)
Verfeinerung		
Auflösungsbereich (Å)	42,94-2,36 (2,44-2,36)	48,17-2,06 (2,13-2,06)
Gemessene Reflexe	84439	125691
R-Faktor / R _{free} -Faktor (%)	21,1/24,9	22,4/ 26,2
Anzahl der Atome	13074	13106
Protein	12878	12894
Fragment	78	17
Wasser	76	195
B-Faktoren (Å ²)	69,89	59,11

Ergebnisse

Protein (\AA^2)	69,85	59,24
Fragment (\AA^2)	84,08	58,20
Wasser (\AA^2)	57,82	50,67
R.m.s. Abweichungen von Idealwerten		
Bindungslängen (\AA)	0,021	0,013
Bindungswinkel ($^\circ$)	2,31	1,99

a: Werte der äußersten Schale.

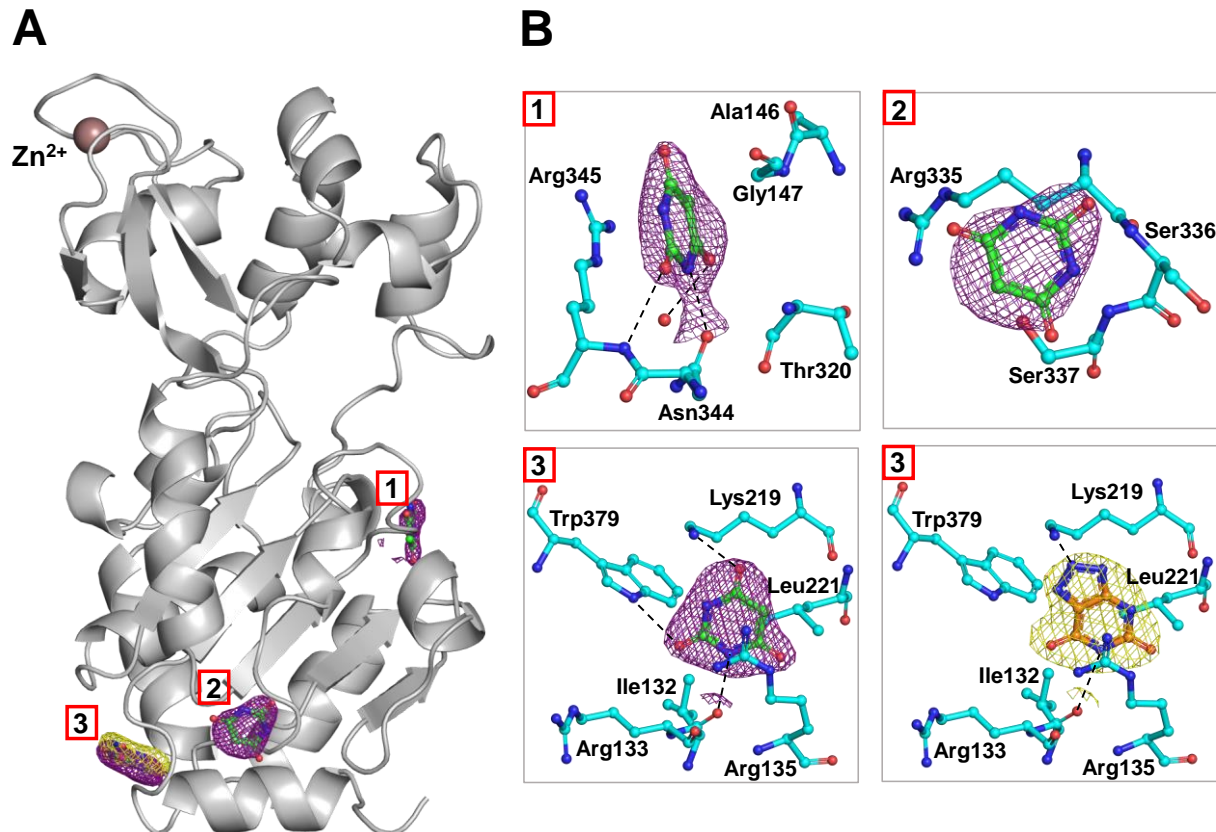


Abbildung 13 Zwei Sirt3/Fragment-Komplexe als Ergebnis des kristallografischen Fragment-Screenings. (A) Überlagerung der Sirt3/Fragment-Komplexe in Cartoon-Darstellung mit den gebundenen Fragmenten gezeigt als Stäbchen. Die überlagerte $2F_o - F_c$ -Elektronendichte konturiert bei $1,0 \sigma$ der Barbitursäure (Grün) ist in Lila und von Azaxanthin (Orange) in Gelb und die Elemente Stickstoff und Sauerstoff in Blau und Rot dargestellt. Die drei Bindungsstellen der Barbitursäure sind nummeriert und Rot umrandet. (B) Vergrößerte Ansicht der Fragmente mit der überlagerten $2F_o - F_c$ -Elektronendichte konturiert bei $1,0 \sigma$ (gleiches Farbschema wie in A) und den beschrifteten, interagierenden Seitenketten (Cyan). Wasserstoffbrückenbindungen bis zu einem Donor-Akzeptor-Abstand von $3,2 \text{ \AA}$ sind als schwarz gestrichelte Linien und Wassermoleküle als rote Kugeln abgebildet.

Das Tränken (*soaking*) mit den Fragmenten führte zu keiner Änderung der Raumgruppe oder der Zellkonstanten (Tabelle 12). Das Molekül der Barbitursäure ist

in allen sechs Monomeren gebunden (Abbildung 13B; Position 1). Die Kette A zeigt drei Elektronendichten für die Barbitursäure. Für Azaxanthin ist hingegen lediglich in der Kette A eine passende Elektronendichte zu finden. Die Bindungsstelle von Azaxanthin wird auch von der Barbitursäure eingenommen und befindet sich in der Position 3 (Abbildung 13A, B). Die Überlagerung der Kette A der Fragment-Strukturen mit der Kette A der Apoform zeigen eine hohe Ähnlichkeit (r.m.s.d. von 0,4 Å für alle C α -Atome). Dementsprechend kam es in Folge der Bindung der Fragmente zu keiner konformationellen Änderung.

Mit einer 100 prozentigen Ligandenbelegung nach Verfeinerung ergab sich für beide Fragmente der Position 3 in Kette A ein Korrelationskoeffizient im realen Raum (real-space correlation coefficients, RSCC) von über 0,9 (Tabelle 13). Entsprechend der Validierung von Ligandenbindungen durch Deller und Rupp¹⁶¹ handelt es sich um die oberste Kategorie mit einer gut zum Liganden passenden Elektronendichte. Die Ligandenbindungen mit einem RSCC-Wert über 0,8 fällt in die zweite Kategorie und ist somit ebenfalls überzeugend. Die Bindung der Barbitursäure in Position 2 mit einem RSCC von 0,7 ist nicht eindeutig.

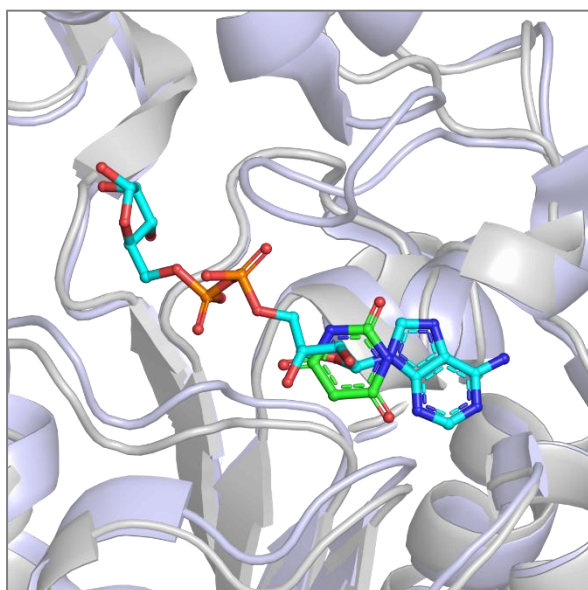


Abbildung 14 Überlagerung des Sirt3/Barbitursäure-Komplexes (Grau) und des Sirt3/ADPr-Komplexes (Hellblau, pdb-Eintrag: 4BN4) in Cartoon-Darstellung mit der Barbitursäure (Grün) und ADPr (Cyan) gezeigt als Stäbchen. Die Elemente Stickstoff, Sauerstoff und Phosphor sind in Blau, Rot bzw. Orange dargestellt.

Tabelle 13 Bindungsstellen der Fragmente und die dazu gehörigen Korrelationskoeffizienten im realen Raum.

Fragment	Kette	Position	RSCC ^a
Azaxanthin	A	3	0,90
Barbitursäure	A	1	0,84
	B	1	0,86
	C	1	0,72
	D	1	0,84
	E	1	0,82
	F	1	0,84
	A	2	0,70
	A	3	0,93

a: RSCC = *real-space correlation coefficients*.

Die Position 1 der Barbitursäure befindet sich in der ADPr-Bindungsstelle (Abbildung 14). Die zwei Carbonylsauerstoffe der Barbitursäure bilden mit dem Stickstoff der Peptidbindung des Arg345 und einem Wassermolekül Wasserstoffbrückenbindungen aus. Des Weiteren erfolgt eine Wasserstoffbrückenbindungen zwischen einem der zwei Stickstoffe des Fragmentes und dem Seitenketten-Sauerstoff von Asn344. Die zweite Bindungsstelle der Barbitursäure sowie die Bindungsstelle von Azaxanthin, welche aufgrund der hohen RSCC-Werte überzeugend sind, befinden sich entfernt von dem aktiven Zentrum. Die Seitenketten-Stickstoffe von Lys219 und Trp379 sowie der Sauerstoff der Peptidbindung von Ile132 bilden mit der Barbitursäure Wasserstoffbrückenbindungen aus. Azaxanthin interagiert ebenfalls mit Lys219 und Ile132 sowie dem Arg135 und Leu221.

Um den Einfluss der Fragmente auf die Deacetylaseaktivität von Sirt3 zu untersuchen, wurde ein enzymgekoppelter Aktivitätstest durchgeführt. Hierbei wird das Produkt der Sirtuinreaktion Nicotinamid (NAM) mit Enzymen (Nicotinamidase und Glutamatdehydrogenase) und unter Oxidation von NADPH zu NADP⁺ umgesetzt. Die daraus resultierende Abnahme der Absorption wurde für 60 min bei 340 nm verfolgt und die Aktivität aus der Steigung bestimmt. Das verwendete Peptid-Substrat leitet sich von der Sequenz (TRSG-ackK-VMRRL) des Sirt3-Substrates Acetyl-CoA Synthetase 2 (ACS2) ab. Um ausschließen zu können, dass die Fragmente keinen Einfluss auf die gekoppelten Enzyme haben, wurde jeweils eine Kontrollreaktion mit NAM durchgeführt. Wie in Abbildung 15A zu sehen ist, steigt die Deacetylaseaktivität in Anwesenheit von Barbitursäure geringfügig und sinkt im Falle von Azaxanthin. Da die Kontrolle mit NAM allerdings die gleiche Tendenz zeigt, ist davon auszugehen, dass der durch die Fragmente verursachte Effekt auf den Einfluss der gekoppelten Enzyme zurückzuführen ist und somit dieser Aktivitätstest nicht geeignet ist.

In einem fluoreszenzbasierten Denaturierungsexperiment (*Differential Scanning Fluorometry*, DSF) sollte der Einfluss der Fragmente auf die Stabilität von Sirt3 untersucht werden. Das Fluoreszenzsignal wird dabei durch das Fluorophor *Sypro orange* hervorgerufen. Im nativen Zustand des Proteins interagiert der Farbstoff nicht mit dem Protein und die Fluoreszenz bleibt gering. Sobald das Protein sich entfaltet, bindet der Farbstoff an die zugänglich werdenden hydrophoben Bereiche des Proteins, was in einem starken Fluoreszenzsignal resultiert bis Aggregation des

denaturierten Proteins das Fluoreszenzsignal abschwächt. Die Entfaltungskurve in Anwesenheit der Fragmente zeigt im Vergleich zur Entfaltungskurve von Sirt3 ohne Fragmente keinen Unterschied (Abbildung 15B). Ein Einfluss auf die thermische Stabilität von Sirt3 durch Azaxanthin und Barbitursäure konnte nicht nachgewiesen werden.

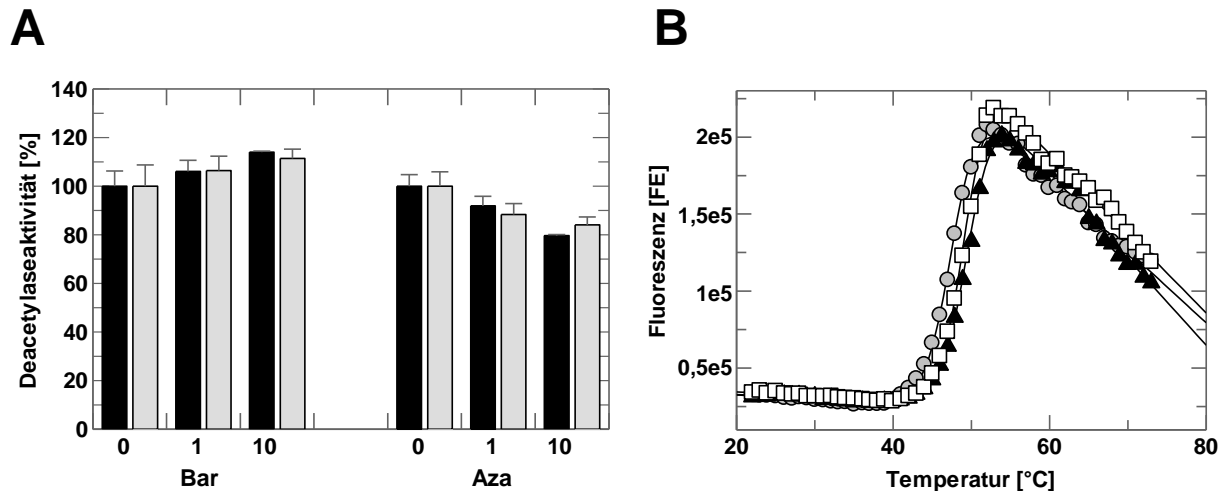


Abbildung 15 Die Fragmente zeigen weder einen Einfluss auf die Deacetylaseaktivität noch auf die thermische Stabilität von Sirt3. (A) Enzymgekoppelter Aktivitätstest mit 0, 1, 10 mM Barbitursäure (Bar) bzw. Azaxanthin (Aza) (2 mM DTT, 3,3 mM α -Ketoglutarat, 0,5 mM NADPH, 1 mM NAD⁺, 37,5 U/mL, 0,05 g/L, 0,4 µM, 0,1 mM ACS2 bei 20 °C) durchgeführt ohne NAM (Schwarz) und mit 100 µM NAM (Grau). (B) Fluoreszenzbasiertes Denaturierungsexperiment von Sirt3 ohne Fragment (□), mit 10 mM Barbitursäure (●) und mit 10 mM Azaxanthin (▲). Fluoreszenz (Fluoreszenzeinheiten, FE) in Abhängigkeit von der Temperatur.

3.3 Das Protein *Active Regulator of Sirt1*

Neben Kleinmolekülen wurden auch einige Proteine als Regulatoren der Sirtuine identifiziert. Das als Sirt1-Aktivator beschriebene AROS ist bisher das einzige Protein, welches die Deacetylaseaktivität von Sirt1 vermutlich stimuliert. Der potenzielle Aktivierungsmechanismus ist jedoch ungeklärt. Des Weiteren ist nur wenig über das Protein selbst bekannt. In diesem Teil der Arbeit wird AROS zunächst charakterisiert. Im Anschluss wird die Interaktion mit Sirt1 und dessen Auswirkung auf die Deacetylaseaktivität sowie die Isoformspezifität beschrieben. Im letzten Kapitel erfolgt die strukturelle Charakterisierung des Komplexes.

3.3.1 Bioinformatische Analyse von AROS

Das humane AROS-Protein (Uniprot-Eintrag: Q86WX3) besteht aus 136 Aminosäuren und besitzt ein kalkuliertes Molekulargewicht von 15,4 kDa und einen isoelektrischen Punkt (pI) von 10,75^{135,162}. Der hohe pI setzt sich aus einem vergleichsweise hohen Anteil basischer Aminosäuren wie Lysine und Arginine (Tabelle 14) zusammen. Die Aminosäurezusammensetzung ist zudem durch eine geringe Sequenzkomplexität sowie einen geringen Anteil von großen, unpolaren und sperrigen Aminosäuren wie Isoleucin und Tryptophan gekennzeichnet.

Tabelle 14 Aminosäurezusammensetzung von humanem AROS im Vergleich zum humanen Proteom. Gezeigt ist eine Auswahl an Aminosäuren des AROS-Proteins, die im Vergleich zum humanen Proteom in einer über- bzw. unterdurchschnittlichen Häufigkeit auftreten.

Aminosäure	Vorkommen AROS ^{135,162} in %	Vorkommen humanes Proteom ¹⁶³ in %
Arginin	12,5	5,64
Lysin	12,5	5,72
Isoleucin	1,5	4,33
Methionin	0,7	2,13
Tryptophan	0	1,22

Eine Sequenzanalyse ergab weder eine Ähnlichkeit zu anderen Proteinen noch das Vorhandensein von Proteinmotiven. Vorhersagen über die Strukturiertheit des AROS-Proteins mit zwei verschiedenen Programmen (DISOPRED¹³⁶, PONDR®¹³⁷) lassen vermuten, dass es sich um ein teilweise unstrukturiertes Protein handelt (Abbildung 16A). Mit Hilfe von PSIPRED¹⁶⁴ wurde eine Analyse hinsichtlich potenzieller Sekundärstrukturelemente durchgeführt. Die Abbildung 16B zeigt, dass sich in der AROS-Sequenz unstrukturierte Bereiche mit potenziell α -helikalen Bereichen abwechseln. Die Programme führten teilweise zu unterschiedlichen Ergebnissen. Für die Aminosäuren 21 bis 54 sagten die Programme DISOPRED und PONDR® einen unstrukturierten Bereich vorher. Laut PSIPRED handelt es sich hingegen bei den Aminosäuren 37 bis 49 um einen α -helikalen Bereich bzw. um eine kleine ungeordnete Region mit Potential eine strukturierte Form (α -Helix) anzunehmen.

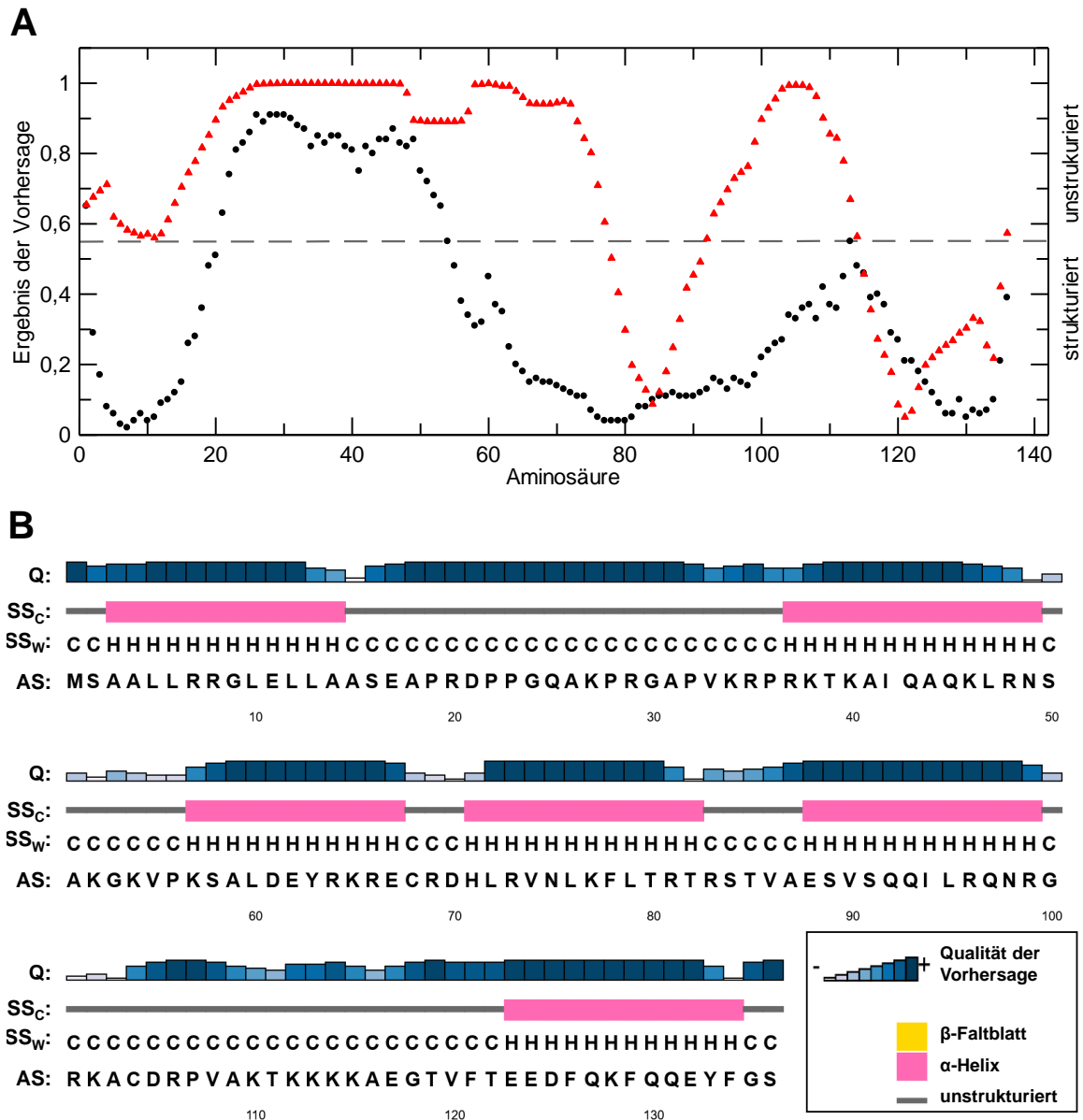


Abbildung 16 Vorhersagen über Strukturiertheit und Sekundärstrukturelemente des AROS-Proteins. (A) Die Vorhersage über Strukturiertheit erfolgte mit den Programmen DISOPRED¹³⁶ (Schwarz) und PONDRL¹³⁷ (Rot). (B) Die Vorhersage über Sekundärstrukturelemente erfolgte mit dem Programm PSIPRED¹⁶⁴. Die Qualität der Vorhersage wird in einer Skala von Weiß (-; schlecht) bis Blau (+; gut) dargestellt. Sekundärstrukturelemente werden als Buchstabe (SS_W; H: α-Helix; C: unstrukturiert, coil) und in Cartoon-Optik (SS_C; Pink: α-Helix; Grau: unstrukturiert) dargestellt.

3.3.2 Expression, Reinigung und Renaturierung von AROS

Zur biochemischen und strukturellen Charakterisierung von AROS sowie des Regulationsmechanismus von Sirt1 durch AROS sollte das Protein in ausreichenden Mengen hergestellt werden. Dazu erfolgte die rekombinante Überexpression in *E.coli*.

Es wurden verschiedene AROS-Konstrukte mit unterschiedlichen Fusionsproteinen kloniert und hinsichtlich Expressionsmenge und Löslichkeit getestet (Tabelle 15).

Tabelle 15: Getestete AROS-Konstrukte und ihre Aminosäurengrenzen, ihre Expression und ihre Löslichkeit.

Konstrukt	Aminosäuren	Löslichkeit	Kommentar
6xHis-MBP-TEV-AROS	136	gut	Fragmentierung, Aggregation nach MBP-Entfernung
6xHis-GST-TEV-AROS	136	unlöslich	-
6xHis-SUMO-TEV-AROS	136	unlöslich	-
6xHis-GFP-TEV-AROS	136	gut	Fragmentierung
AROS-TEV-GFP-6xHis	136	gering	-
AROS-TEV-6xHis	136	unlöslich	-
6xHis-TEV-AROS	136	unlöslich	-
6xHis-TEV-AROS	39-136	unlöslich	-
6xHis-TEV-AROS	1-89	unlöslich	-
6xHis-TEV-AROS	55-108	unlöslich	-

Da sowohl Volllänge-AROS als auch C- und N-terminal verkürzte Varianten von AROS in unterschiedlichen *E. coli*-Zelllinien unter diversen Expressionsbedingungen in Einschlusskörperchen akkumulierten, wurde das Protein mit löslichkeitsvermittelnden Partnern fusioniert. Insbesondere die N-terminale Fusion von GFP und MBP konnte die Löslichkeit des rekombinanten Proteins signifikant erhöhen. Allerdings zeigte sich, dass der C-Terminus von AROS anfällig für eine Fragmentierung ist. Diese konnte auch nicht durch Zugabe von Proteaseinhibitoren unterdrückt werden. Zudem resultierte die Entfernung der MBP-Fusion zu einer Aggregation von AROS. Daher wurde AROS aus Einschlusskörperchen gewonnen.

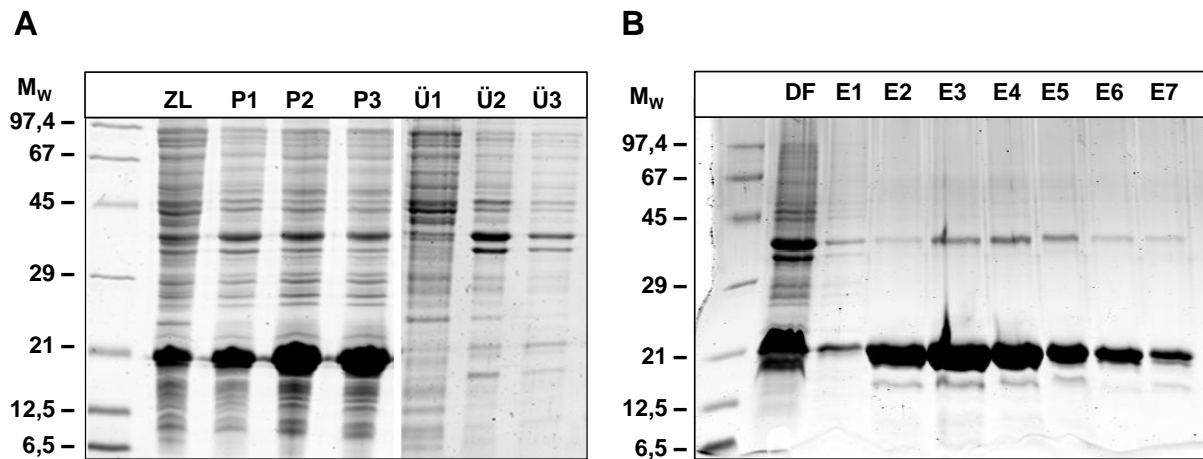


Abbildung 17: SDS-PAGE der Präparation der Einschlusskörperchen und der Affinitätschromatographie unter solubilisierenden Bedingungen. (A) Das unlösliche AROS wurde aus dem Zelllysate (ZL) mit Hilfe von Zentrifugation im Pellet (P1) als Einschlusskörperchen gewonnen und zweimal gewaschen (P2, P3). Die Überstände Ü1-3 wurden verworfen. (B) Die SDS-PAGE der Affinitätschromatographie unter solubilisierenden Bedingungen (DF: Durchfluss; E1-E7: Elutionsfraktionen 1 bis 7).

AROS mit einer N-terminalen Hexahistidin-Erkennungssequenz zeigte in C43 (DE3) Zellen die beste Expression. Das rekombinante Protein befindet sich nach Zellaufschluss und Zentrifugation in der unlöslichen Fraktion (Abbildung 17; P1). Trotz Zugabe von 1,5 M NaCl und 6 % Triton X-100 zum Zelllysate ist das Pellet mit den Einschlusskörperchen mit anderen Proteinen verunreinigt. Durch einen weiteren Waschschriff mit 100 mM Tris/ HCl pH 7 konnte eine Verunreinigung von ca. 40 kDa teilweise entfernt werden (Ü2). AROS wurde durch Zugabe einer hohen Konzentration (6 M) der chaotropen Substanz Guanidiniumhydrochlorid (GdnHCl) solubilisiert. Um reines Ausgangsmaterial für die anschließende Renaturierung zu erhalten, wurde als weiterer Reinigungsschriff eine Affinitätschromatographie unter solubilisierenden Bedingungen (4 M GdnHCl) durchgeführt. Die Fraktion E2-E4 der ersten Affinitätschromatographie (Abbildung 17) enthielten hohe Konzentrationen an reinem AROS. Versuche, das an einer Säule gebundene AROS durch stufenweise Reduzierung des GdnHCl in Lösung zu bringen, führten nur zu sehr geringen Ausbeuten. Das solubilierte Protein in mehreren Schritten gegen Puffer mit sinkender GdnHCl-Konzentration zu dialysieren, resultierte in stark aggregiertem Protein. Daher wurde AROS direkt in einem Puffersystem ohne GdnHCl verdünnt. Um ein geeignetes Puffersystem zu finden, wurde solubilierten AROS in verschiedenen Puffersystemen verdünnt und die Aggregatbildung bei 320 nm detektiert. Dabei wurde die

Aggregatbildung unter oxidierenden sowie reduzierenden Bedingungen mit Glutathion untersucht. Zusätzlich zu einem pH-neutralen und einem leicht basischen Puffersystem (pH 8,3) wurde auch der Einfluss von L-Arginin untersucht. Weder der Zustand des Redoxsystems noch der pH-Wert führte zu einer signifikanten Reduktion der Aggregation. Wie in Abbildung 18A zu sehen ist, wurde die Aggregatbildung durch 0,8 M L-Arginin stark reduziert.

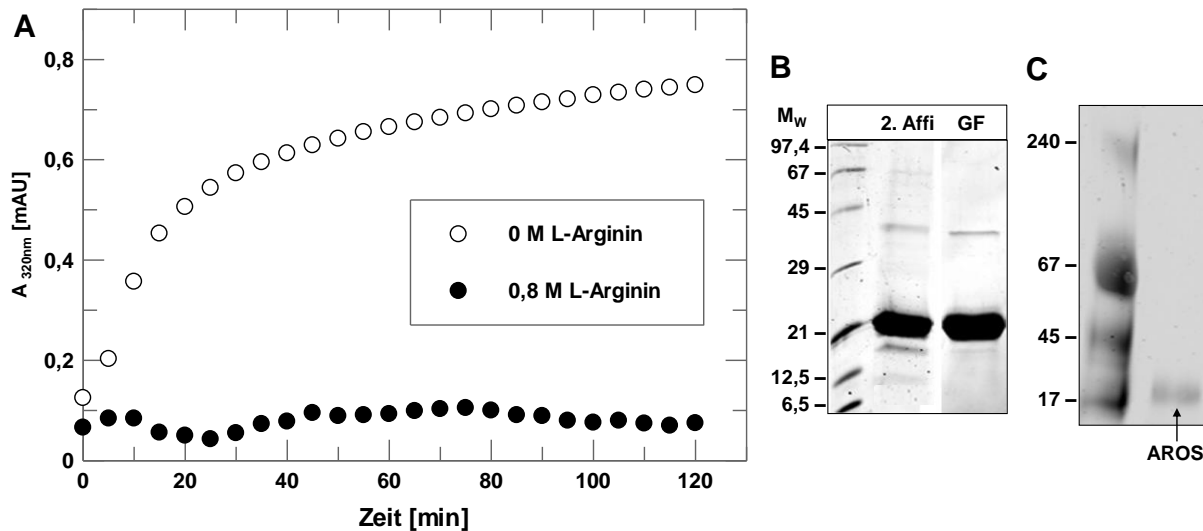


Abbildung 18: L-Arginin reduziert die Aggregatbildung während der Renaturierung des reinen, monomeren AROS-Proteins. (A) Die Aggregationsbildung während der Renaturierung von AROS wurde in An- und Abwesenheit von L-Arginin bei einer Absorption von 320 nm (A_{320nm}) verfolgt in milli Absorptionseinheiten (mAU). (B) SDS-PAGE mit Proben der zweiten Affinitätschromatographie (2. Affi) und der Gelfiltration (GF). (C) Natives Polyacrylamidgel des renaturierten AROS.

Zur Reduzierung der Aggregatbildung wurde, neben der Verwendung von L-Arginin als löslichkeitsvermittelndes Additiv, eine niedrige Proteinkonzentration (50 mg/L) eingesetzt. Durch langsames Hinzufügen von 50 mg des solubilisierten Proteins in 1 L Puffer (100 mM Tris pH 7,0, 0,8 M L-Arginin) sowie langsames Rühren und zweistündiger Inkubation konnte AROS in Lösung gebracht werden. Die besten Ausbeuten wurden durch wiederholte Verdünnung mit insgesamt drei Verdünnungsschritten erzielt. Um das Protein anschließend zu konzentrieren, wurde eine zweite Affinitätschromatographie durchgeführt, die in löslichem AROS resultierte.

Der letzte Reinigungsschritt war eine Größenausschlusschromatographie. Das Elutionsprofil ist in Abbildung 19 zu sehen. AROS eluierte als einzelner Peak. Der Vergleich mit einem Proteinstandard zeigte, dass AROS bei einem niedrigerem Elutionsvolumen eluierte als zu erwarten war. Das tatsächliche Elutionsvolumen

korrespondiert mit einem Molekulargewicht von 34 kDa, statt des theoretischen Molekulargewichts von 17,4 kDa (His₆-AROS). Eine Gelfiltration des solubilisierten AROS in 4 M Harnstoff bzw. GdnHCl zeigte im Vergleich zu renaturiertem AROS ein geringeres Elutionsvolumen und eluierte bei höheren Molekulargewichten (Abbildung 19B). Das renaturierte AROS scheint daher eine kompaktere Faltung zu besitzen als das durch die chaotropen Substanzen entfaltete AROS.

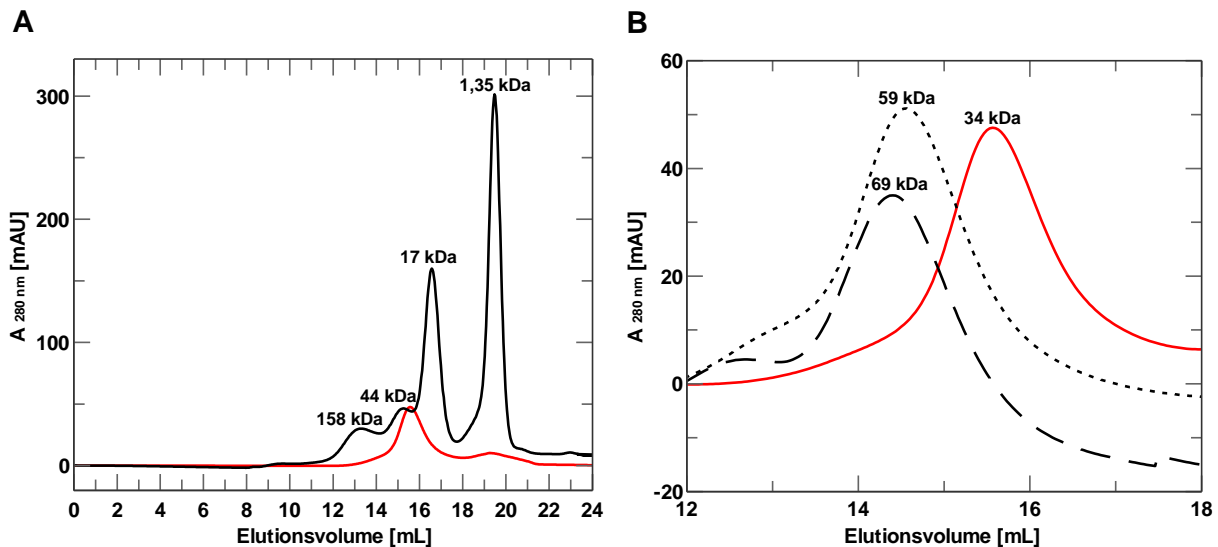


Abbildung 19: Renaturiertes AROS eluiert als einzelner Peak in der Größenausschlusschromatographie. (A) Abgebildet ist das Elutionsprofil der Gelfiltration des gereinigten, renaturierten AROS (Rot) im Vergleich zu einer Gelfiltration mit Markerproteinen (Schwarz). (B) Die Elutionsspitzen der Gelfiltrationen mit renaturiertem (Rot) und in 4 M Harnstoff (Schwarz, gepunktet) bzw. 4 M GdnHCl (Schwarz, gestrichelt) solubilisiertem AROS.

Das Elutionsverhalten während der Größenausschlusschromatographie ließ vermuten, dass AROS als Dimer vorliegt. Um den Oligomerisierungszustand des renaturierten Proteins zu analysieren, wurde ein Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen (Abbildung 18C) durchgeführt. Da AROS einen theoretischen isoelektrischen Punkt von 10,75 besitzt, konnte das auf einem Glycerolpuffer basierende Standardprotokoll¹³¹ nicht verwendet werden. Stattdessen wurde ein für basische Proteine optimiertes Protokoll, welches Histidin als dipolares Folgeion nutzt, verwendet¹³². AROS läuft als einzelne Bande etwas höher als das Markerprotein Myoglobin mit 17 kDa und somit wie das zu erwartenden Monomer. Neben dieser Bande ist keine weitere Form eines anderen Oligomerisierungszustandes zu sehen. Dass AROS ein vom Molekulargewicht abweichendes Laufverhalten in einem Polyacrylamidgel aufweist, wurde bereits unter denaturierenden Bedingungen

festgestellt. Dies könnte an dem hohen Anteil positiv geladener Aminosäuren wie Lysin und Arginin, welcher zu einer starken Eigenladung des Proteins führt, liegen. Das native Polyacrylamidgel zeigt, dass AROS als Monomer in Lösung vorliegt. Das Laufverhalten des renaturierten, monomeren AROS-Proteins während der Gelfiltration deuten darauf hin, dass es sich vermutlich um ein nicht globuläres Protein handelt.

3.3.3 Analyse der Sekundär- und Tertiärstruktur des renaturierten AROS

Um weitere Informationen zur Struktur von AROS zu erhalten, wurden Experimente mittels CD-Spektroskopie durchgeführt. Das CD-Spektrum von renaturierten AROS zeigt ein Minimum bei 203 nm und ein Plateau bei 217 bis 227 nm (Abbildung 20B). In Abbildung 20A ist ein Spektrum mit Konformationen reiner α -Helices, β -Faltblätter sowie vollständiger Unordnung (*random coil*) zu sehen¹⁶⁵. Der Vergleich zeigt, dass das CD-Spektrum von AROS im Gegensatz zu einem unstrukturierten Protein ein Minimum oberhalb von 200 nm und ein negatives Plateau oberhalb von 210 nm aufweist und somit Strukturelemente besitzt. Zudem ergab eine Analyse des CD-Spektrums mit dem Programm BESTSEL¹³⁴, dass sich die Sekundärstruktur von AROS aus 11,1 % α -Helices, 12,4 % β -Strang und einem unstrukturierten Anteil von 76,5 % zusammensetzt. Die Zugabe von 6 M Harnstoff resultierte in einer Auflösung des strukturierten Anteils im Protein, da das CD-Spektrum (Abbildung 21C) mit der chaotropen Substanz kein negatives Plateau im Bereich von 217 bis 227 nm zeigt.

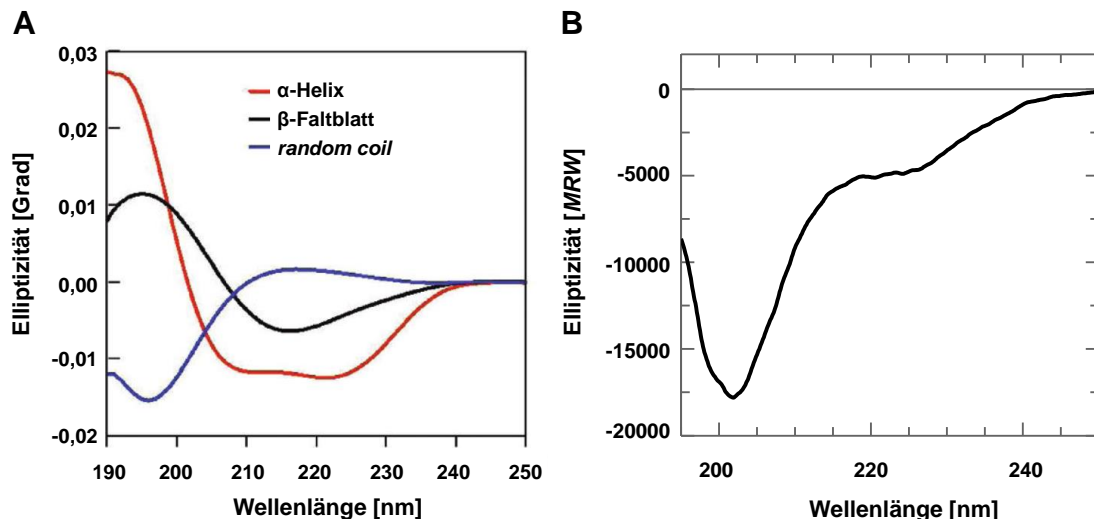


Abbildung 20 Fern-UV CD-Spektrum des renaturierten AROS im Vergleich zu Fern-UV CD-Spektren von charakteristischen Sekundärstrukturelementen in Proteinen. (A) CD-Spektren eines simulierten polylysine in reiner α -Helix (Rot), β -Faltblatt (Blau) sowie vollständiger Unordnung (*random coil*, Schwarz)¹⁶⁵. (B) CD-Spektrum des renaturierten AROS mit einer Proteinkonzentration von 10 μ M aufgenommen in einem $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer.

Flexible Proteine zeigen oftmals die Fähigkeit bei entsprechenden Bedingungen, wie z.B. in Folge der Bindung mit einem Interaktionspartner, eine strukturiere Konformation einzunehmen. Die bioinformatische Sekundärstrukturanalyse von AROS mit einem α -helikalen Anteil von 53 % lässt ein solches Verhalten vermuten. Daher wurde mit CD-Spektroskopie der Einfluss der strukturinduzierenden Substanz Trifluorethanol (TFE) untersucht. TFE ist in der Lage existierende α -Helices zu stabilisieren und die Bildung neuer α -Helices zu induzieren. Die CD-Spektren (Abbildung 21A) zeigen, dass sich mit steigender Konzentration von TFE der α -helikale Anteil erhöht und die Analyse mit BESTSEL ergab, dass der α -helikale Anteil von zuvor 11,1 % auf 37 % in Anwesenheit von 20 % TFE steigt. Des Weiteren resultiert die Zugabe von 50 % TFE zu AROS in einer thermischen Entfaltung des Proteins mit einer Schmelztemperatur (T_m) von $59,7 \pm 1,8$ °C. Dies wurde mit Hilfe eines fluoreszenz-basierten Denaturierungsexperimentes gezeigt (Abbildung 21D). Die Kurve von AROS ohne TFE zeigte keine Veränderung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur. Bei der Kurve mit TFE bleibt die Fluoreszenz im nativen Zustand des Proteins zunächst konstant und steigt ab ca. 47 °C kontinuierlich bis zu einer maximalen Fluoreszenz von ca. $2,5 \cdot 10^6$ FE (Fluoreszenzeinheiten) bei 65°C. Anschließend bleibt die Fluoreszenz konstant bzw. sinkt aufgrund von Aggregation leicht.

AROS ist somit ein flexibles Protein mit einer partiellen Faltung sowie einer hohen Neigung, signifikante Mengen zusätzlicher α -Helices bis hin zu einer kompakten Tertiärstruktur bei entsprechenden Bedingungen (z.B. 50 % TFE) zu bilden. In physiologischer Hinsicht könnte dieses Verhalten ebenfalls bei entsprechenden Bedingungen wie z.B. in Folge der Bindung mit einem Interaktionspartner auftreten. Eine weitere Substanz, dessen Einfluss auf die Sekundärstruktur von AROS untersucht werden sollte, ist Glycerol. Hierbei handelt es sich um ein Molekül, welches das molekulare *crowding* in einer Zelle *in vitro* nachahmt. Da in einer Zelle eine hohe Konzentration von bis zu 400 mg/ml an Makromolekülen, wie Proteinen, Nukleinsäuren, Kohlenhydraten sowie eine Vielzahl weiterer Metabolite vorliegt, können bis zu 40 % des Zellvolumens besetzt sein. Dieses molekulare *crowding* wird durch hohe Konzentrationen von Glycerol nachgeahmt. Die Glycerolmoleküle nehmen einen hohen Volumenanteil in der Lösung ein. Dieser Platz steht nicht mehr für andere biologische Makromolekül wie z.B. ein Protein zur Verfügung. Dadurch kann die

molekulare Beweglichkeit und Dynamik des Proteins verringert werden, was zu einer anderen Konformation des Proteins führen könnte¹⁶⁶. Ebenso wie TFE induziert auch Glycerol die α -Helix-Bildung in AROS (Abbildung 21B). Der α -helikale Anteil steigt von 11,1 % auf 24,5 % in Anwesenheit von 50 % Glycerol. Somit konnte *crowding* als ein weiterer Faktor identifiziert werden, der die AROS-Faltung in einer physiologischen Umgebung beeinflussen könnte.

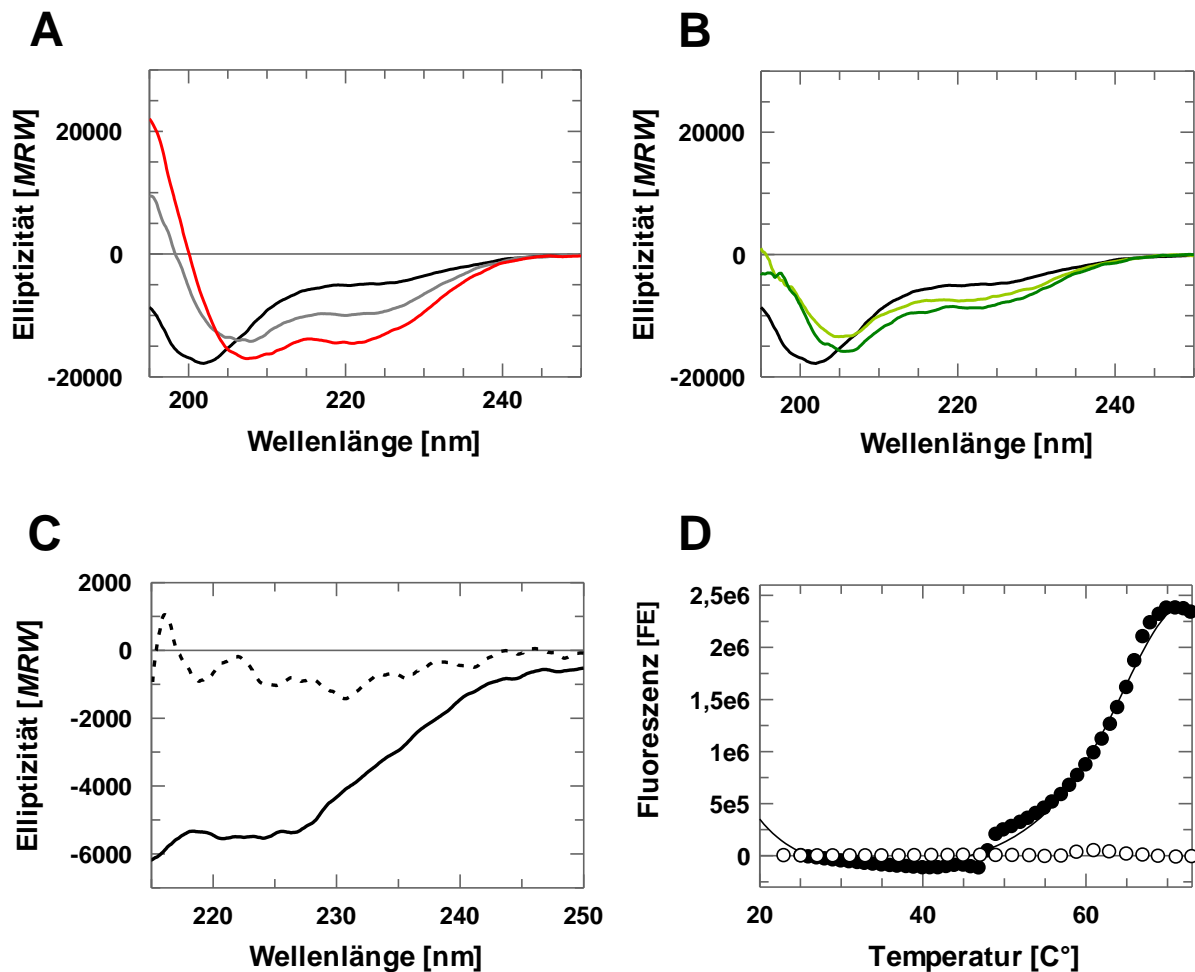


Abbildung 21 Einfluss verschiedener Substanzen auf die Sekundär- und Tertiärstruktur von AROS. (A) CD-Spektren einer TFE-Titration (0 % Schwarz, 10 % Grau, 20 % Rot) mit AROS. (B) CD-Spektren einer Glycerol-Titration (0 % Schwarz, 40 % Hellgrün, 50 % Dunkelgrün) mit AROS. (C) CD-Spektren in An- (gestrichelte Linie) und Abwesenheit (durchgezogene Linie) von 6 M Harnstoff. (D) Fluoreszenzbasiertes Denaturierungsexperiment von AROS mit 50 % TFE (Schwarz) und ohne TFE (Weiß).

Nach der CD-Spektroskopie wurde auch die Kernspinresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance, NMR) zur genaueren, strukturellen Charakterisierung von AROS verwendet. Hierzu wurde AROS in Minimalmedium mit dem Isotop ¹⁵N exprimiert und

anschließend gereinigt. Das Spektrum des durchgeführten ^{15}N -*heteronuclear single quantum correlation* (HSQC) Experimentes ist in Abbildung 22A zu sehen. $[\text{}^1\text{H},^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren zeigen die Korrelation der Amidprotonen-Resonanzen mit den Resonanzen des direkt daran gebundenen Stickstoffs. Unter idealen Bedingungen enthält dieses Spektrum ein Signal für jedes Rückgratamid außer die von Prolinen und Signale für jedes Seitenkettenamid oder jede Indolgruppe. Daher gilt dieses Spektrum als der "Fingerabdruck" eines Proteins¹⁶⁷.

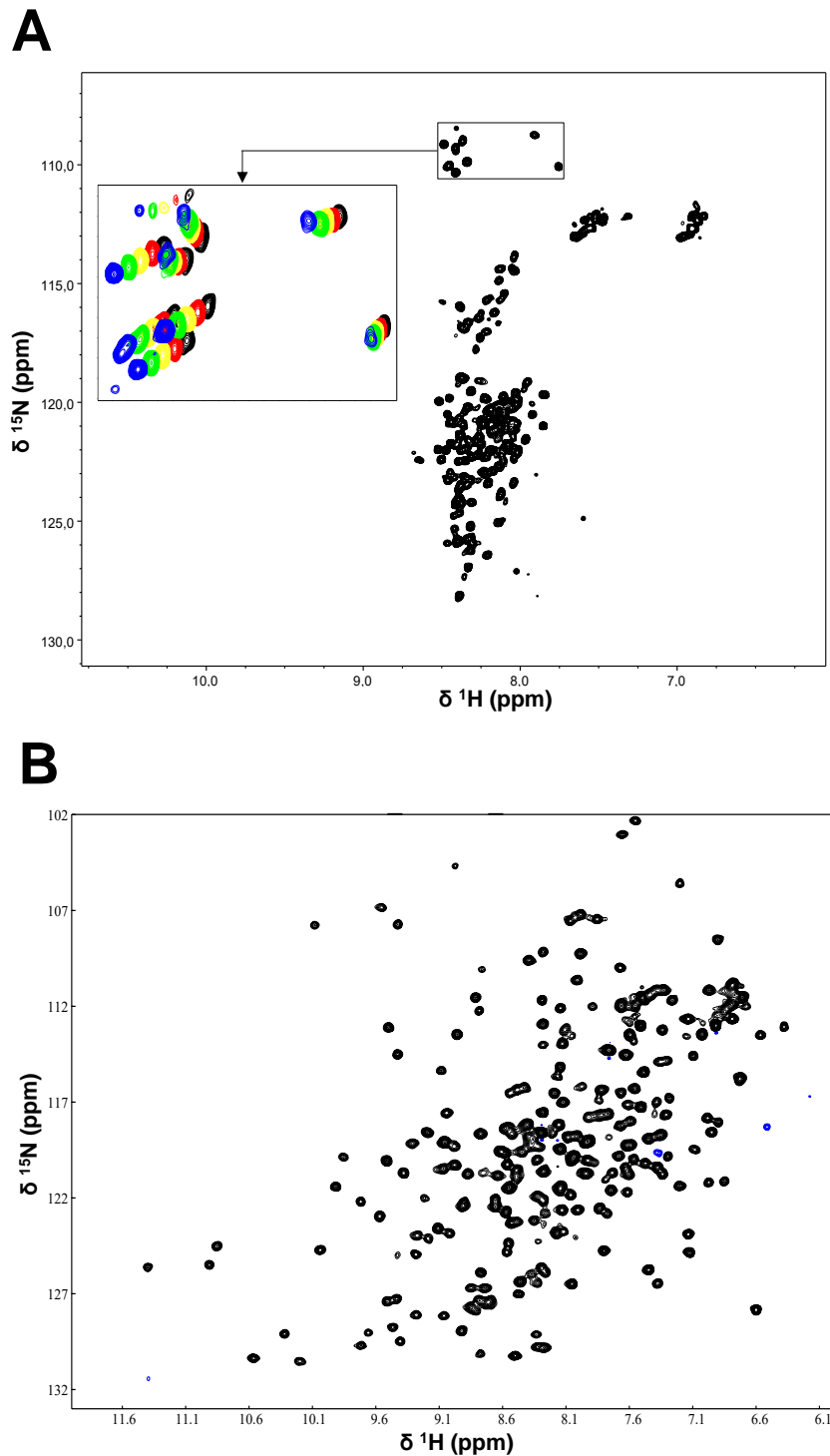


Abbildung 22 2D-NMR von AROS im Vergleich mit einem gefalteten Protein. (A) $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum von 100 μM AROS aufgenommen bei 25 $^{\circ}\text{C}$ in 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 300 mM NaCl und 150 mM L-Arginin bei pH 6,5. Der vergrößerte Ausschnitt der Glycin-Signale zeigt die Abhängigkeit der chemischen Verschiebung von der Temperatur (Schwarz=25 $^{\circ}\text{C}$, Rot=20 $^{\circ}\text{C}$, Gelb=15 $^{\circ}\text{C}$, Grün=10 $^{\circ}\text{C}$, Blau=5 $^{\circ}\text{C}$) (B) ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum von 300 μM hSirt5 aufgenommen bei 25 $^{\circ}\text{C}$ in 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7,0.

Das ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum von AROS zeigt eine geringe Signalverteilung in der ^1H -Dimension im Bereich von mit 6,8 bis 8,3 ppm. Dies weist daraufhin, dass AROS in Abwesenheit eines Bindungspartners und ohne *crowding* keine stabile und vollständige Tertiärstruktur besitzt. Im Vergleich dazu ist ein ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum von hSirt5 (34-302) in Abbildung 22B abgebildet. Hierbei handelt es sich um ein gefaltetes Protein mit breiter Signalverteilung der Amidprotonen in der ^1H -Dimension im Bereich von 6,4 bis 11,4 ppm. Ein Ausschnitt von ^1H - ^{15}N HSQC-Spektren, welche bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen wurde, zeigt die Verschiebung der Signale sowohl in der ^{15}N als auch der ^1H Dimension. Diese temperaturabhängigen Signalverschiebungen unterscheiden sich je nach Aminosäure sowohl hinsichtlich der Richtung als auch der Weite. Für eine vollständige unstrukturierte Proteinkette würden alle temperaturabhängigen Signalverschiebungen gleich ausfallen. Dies deutet auf unterschiedliche chemische Umgebungen der einzelnen Aminosäuren hin und somit auf das Vorhandensein lokaler Strukturelemente. Die Ergebnisse der NMR-Experimente stimmen folglich mit den Erkenntnissen der CD-Messungen überein.

Zur strukturellen Charakterisierung von AROS sollte die Kristallstruktur gelöst werden. Dazu wurden Ansätze mit verschiedenen Proteinkonzentrationen (5 und 10 mg/mL) sowie Temperaturen (4 und 20 °C) und diversen kommerziell verfügbaren Kristallisationsscreens durchgeführt. Diese Bedingungen führten nicht zur Kristallisation von AROS. Auf den Erkenntnissen der CD-Spektroskopie aufbauend, wurden Kristallisationsversuche mit AROS und 10 bzw. 20 % TFE oder 25% Glycerol durchgeführt. Die Zugabe von TFE zu AROS, welches im mg/mL-Bereich vorlag, führte zur Präzipitation des Proteins. Kristallisationsversuche mit dem Überstand des zentrifugierten Proteins, führten nicht zur Kristallisation des Proteins, ebenso wie die Glycerolzugabe.

3.4 Interaktion von AROS mit Sirt1

3.4.1 Stabilisierung des Sirt1/AROS-Komplexes

Bisher gibt es nur wenige Informationen über den Sirt1/AROS-Komplex. Daher sollte zunächst ein stabiler Komplex aus den rekombinant hergestellten, reinen Proteinen hergestellt werden. Hierbei kam es nach Mischung der jeweiligen stabilen Proteinlösung zu einer starken Präzipitation. Deshalb wurde nach einer Pufferbedingung gesucht, die eine stabile Komplexbildung ermöglicht. Dazu wurde die thermische Entfaltung der beiden Proteine im Verhältnis 1:1 in verschiedenen

Puffersystem mit fluoreszenzbasierten Denaturierungsexperimenten gemessen (Abbildung 23). In diesen konnte gezeigt werden, dass nicht nur einzelne Proteine sondern auch Proteinkomplexe unter stabilisierenden Bedingungen ein nahezu ideales Entfaltungsverhalten aufweisen, welches mit Hilfe eines Zweizustandsmodell beschrieben werden kann. Dabei kommt es zu einem einzigen Übergang zwischen einem nativen und einem denaturierten Zustand. Somit ist eine kooperative Entfaltung aller Komponenten ein gutes Zeichen für einen stabilen Komplex. Ein Entfaltungsexperiment von AROS und Sirt1 in einem Standardpuffersystem zur Messung von Bindungskurven mittels mikroskalierbare Thermophorese (MST) führte zu einem Übergang über einen weiten Temperaturbereich. Dieser bestand aus mehreren Phasen, was ein Hinweis für mehrere Entfaltungsereignisse ist. In diesem Puffersystem wurde auch Aggregation beobachtet. Die Verwendung eines 50 mM Tris/HCl-Puffers ohne Tween und NaCl bei pH 7,5 zeigte hingegen einen steilen Übergang in einem kleinen Temperaturbereich und einer Schmelztemperatur (T_m) von $41,4 \pm 0,8$ °C. Ein noch steilerer Übergang sowie eine höhere T_m mit $48,1 \pm 0,3$ °C konnte in einem Phosphatpuffer bei pH 7,0 erreicht werden. Diese Kurve entsprach einem nahezu idealen Übergang vom nativen zum denaturierten Zustand und deutete auf eine signifikante Stabilisierung des Sirt1/AROS-Komplexes hin. Weitere Experimente wurden daher in einem Phosphatpuffer bei pH 7,0 durchgeführt.

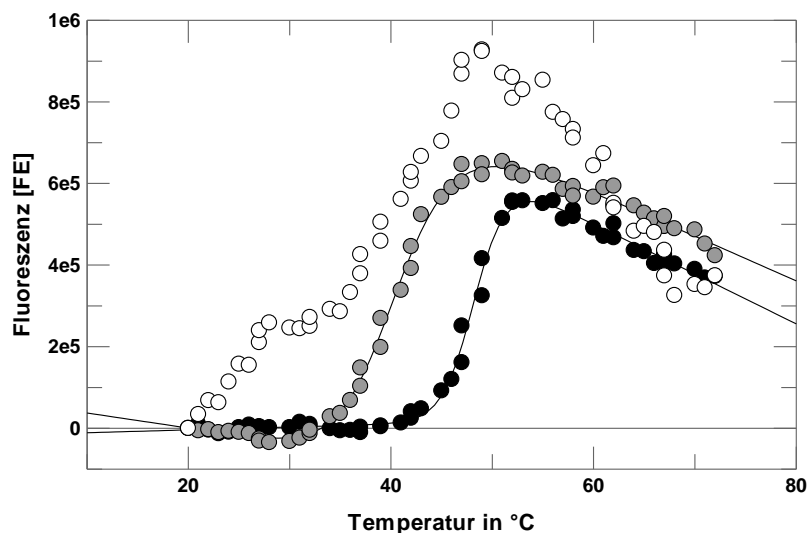


Abbildung 23 Pufferoptimierung ermöglicht die Bildung eines stabilen Sirt1/AROS-Komplexes. DSF-Experimente von 2 μ M Sirt1 und 2 μ M AROS zeigen einen polyphasischen Übergang in 20 mM Tris/HCl pH 7,0; 120 mM NaCl; 0,08 % Tween 20 (Weiß), einen Übergang mit einem steilen Anstieg und einer T_m bei $41,4 \pm 0,8$ °C in 50 mM Tris/HCl pH 7,5 (Grau) sowie einen Übergang mit einem steilen Anstieg und einer T_m bei $48,1 \pm 0,3$ °C in 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7,0 (Schwarz).

3.4.2 AROS inhibiert Sirt1 durch Konkurrenz mit dem Acylsubstrat

Bisherige Studien zur Regulation von Sirt1 durch AROS kamen zu widersprüchlichen Ergebnissen und der tatsächliche Regulationsmechanismus konnte noch nicht geklärt werden. Daher sollte zunächst der Einfluss von AROS auf die Deacetylaseaktivität von Sirt1 untersucht werden. Dazu wurde ein fluoreszenzbasierter Aktivitätstest, bei dem die Fluoreszenz proportional zu der Deacetylierungsaktivität von Sirt1 ist, verwendet. Als Substrat diente das sogenannte *Fluor-de-Lys 1* (FDL-1), welches sich aus der p53-Sequenz Arginin-Histidin-Lysin-Acetyllysine (RHKackK-Cou) und dem Fluorophor Cumarin zusammensetzt. Nach der Sirtuinreaktion liegt deacetyliertes FDL1-Substrat vor, welches anschließend mit der Protease Trypsin geschnitten werden kann und in freiem, fluoreszierendem Cumarin resultiert.

Wie in Abbildung 24A zu sehen, kommt es durch AROS zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition der Deacetylaseaktivität von Volllänge Sirt1 mit einem IC_{50} von $11 \pm 1 \mu M$. Die Kontrollreaktionen mit 10 und 100 μM AROS ohne His₆ (Abbildung 24B) zeigt eine vergleichbare Inhibition wie His₆-AROS (Abbildung 24A). Ein Einfluss der His₆-Sequenz auf die inhibitorische Wirkung von AROS kann somit ausgeschlossen werden. Die Kontrollreaktion (Abbildung 24C; 2) mit AROS und ohne Sirtuin führte zu einem Hintergrundsignal, welches der Eigenfluoreszenz des FDL-1-Substrates entspricht. Eine weitere Kontrollreaktion (Abbildung 24C; 3), bei der AROS nach der tryptischen Abspaltung hinzugefügt wurde, lässt keinen signifikanten Unterschied zur Reaktion mit Sirtuin und ohne AROS (Abbildung 24; 1) erkennen. Folglich hat AROS weder einen Einfluss auf das Fluoreszenzsignal des FDL-1-Substrates noch auf den freien Fluorophor.

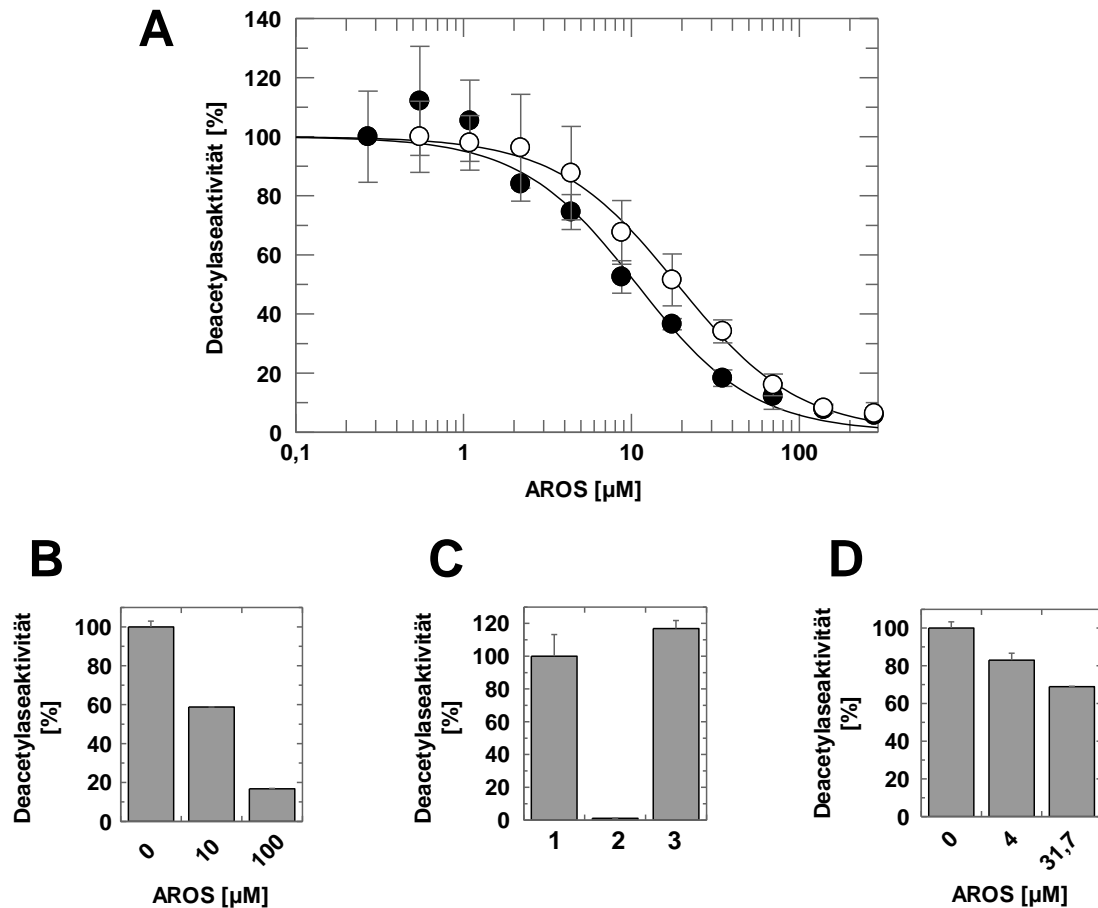


Abbildung 24 Konzentrationsabhängige Inhibition von Sirt1 durch AROS. (A) Aktivitätstest zu IC_{50} -Bestimmung mit 100 μ M FDL-1, 1 μ M Volllänge Sirt1 (Schwarz) bzw. 1 μ M miniSirt1ex687 (Weiß), 0,5 mM NAD und verschiedenen Konzentrationen von His₆-AROS (maximale Konzentration betrug 280 μ M) in 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,0 bei 37 °C. (B) Aktivitätstest (100 μ M FDL-1, 1 μ M Volllänge Sirt1, 0,5 mM NAD bei 37 °C) mit AROS ohne His₆-tag zeigt vergleichbare Inhibition wie His₆-AROS. (C) Kontrollreaktionen (100 μ M FDL-1, 1 μ M Volllänge Sirt1, 0,5 mM NAD, 100 μ M His₆-AROS bei 37 °C) zeigen keinen Einfluss von AROS auf das Fluoreszenzsignal von Cumarin (1: Reaktion mit Sirt1 ohne AROS, 2: Reaktion ohne AROS und ohne Sirtuin, 3: Zugabe von AROS nach Reaktion mit Sirt1). (D) Enzymgekoppelter Aktivitätstest (2 mM DTT, 3,3 mM α -Ketoglutarat, 0,5 mM NADPH, 1 mM NAD⁺, 37,5 U/mL, 0,05 g/L, 0,4 μ M, 0,05 mM p53 bei 20 °C) bestätigt die inhibierende Wirkung von AROS auf Sirt1.

Da es sich bei dem FDL-1 um ein artifizielles Substrat handelt, wurde die Sirt1-Inhibition durch AROS in einem weiteren Aktivitätstest überprüft. Dafür wurde ein enzymgekoppelter Aktivitätstest, bei dem das Produkt der Sirtuinreaktion Nicotinamid mit Enzymen (Nicotinamidase und Glutamatdehydrogenase) und unter Oxidation von NADPH zu NADP⁺ umgesetzt wird, verwendet. Die daraus resultierende Abnahme der Absorption wurde für 60 min bei 340 nm verfolgt und die Aktivität aus der Steigung bestimmt. Das verwendete Peptid-Substrat leitet sich von der Sequenz

des Sirt1-Substrates p53 ab (RHK-acK-LMFK). Die Ergebnisse des enzymgekoppelten Aktivitätstest bestätigen eine signifikante Inhibition der Sirt1-Deacetylaseaktivität durch AROS *in vitro* (Abbildung 24D) und eine direkte Interaktion der beiden reinen Proteine miteinander.

Die Herstellung des rekombinanten Volllänge Sirt1 führte zu sehr geringen Ausbeuten. Daher wurde in einer weiteren AROS-Titration der IC₅₀ für das verkürzte, enzymatisch aktive miniSirt1ex687-Konstrukt ermittelt. Hierbei handelt es sich um eine N-terminal verlängerte Version (20 Aminosäuren) des kristallisierbaren miniSirt1, welches die minimalen Strukturelemente enthält, die für die Lysindeacetylierung und die katalytische Aktivierung durch niedermolekulare Sirtuin-aktivierende Verbindungen (*sirtuin activating compounds*, STACs) erforderlich sind. Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, zeigte AROS eine vergleichbare Inhibition der Deacetylaseaktivität des miniSirt1ex687 mit einem IC₅₀ von $19 \pm 1 \mu\text{M}$. Für nachfolgende Experimente wurde statt des Volllänge Proteins das verkürzte Protein verwendet.

Als nächstes wurde der Mechanismus der AROS abhängigen Inhibition untersucht. Dazu wurden die kinetischen Parameter in Aktivitätstests durch Titrationen der Substrate bestimmt (Tabelle 11). Die Anwesenheit von 40 μM AROS ergibt eine dreifache Erhöhung des K_m-Wertes für das acetylierte Peptidsubstrat FDL-1 (Abbildung 25A) aber nur einen geringfügig höheren K_m-Wert (1,5-fach) für das NAD⁺ (Abbildung 25B). Der v_{max} beider Substrattitrationen ist in Anwesenheit von AROS etwas geringer (1,2 bis 1,4-fach). Dies deutet daraufhin, dass es sich um eine gemischte Inhibition handelt, bei der AROS mit dem acetyliertem Peptidsubstrat aber nicht mit dem Nukleotidsubstrat konkurriert.

Tabelle 16 Zusammenfassung der kinetischen Parameter K_m und v_{max} für die Sirtuinsubstrate FDL-1 und NAD⁺ in An- und Abwesenheit von AROS.

AROS ^a [μM]	Peptid-Kinetik		NAD ⁺ -Kinetik	
	K _m [μM]	v _{max} [FE ^b · 10 ⁶]	K _m [μM]	v _{max} [FE ^b · 10 ⁶]
-	97 ± 11	2,18 ± 0,07	180 ± 19	2,06 ± 0,06
+	266 ± 31	1,76 ± 0,08	276 ± 30	1,47 ± 0,05

a: ± 40 μM AROS; b: Fluoreszenzeinheiten (FE)

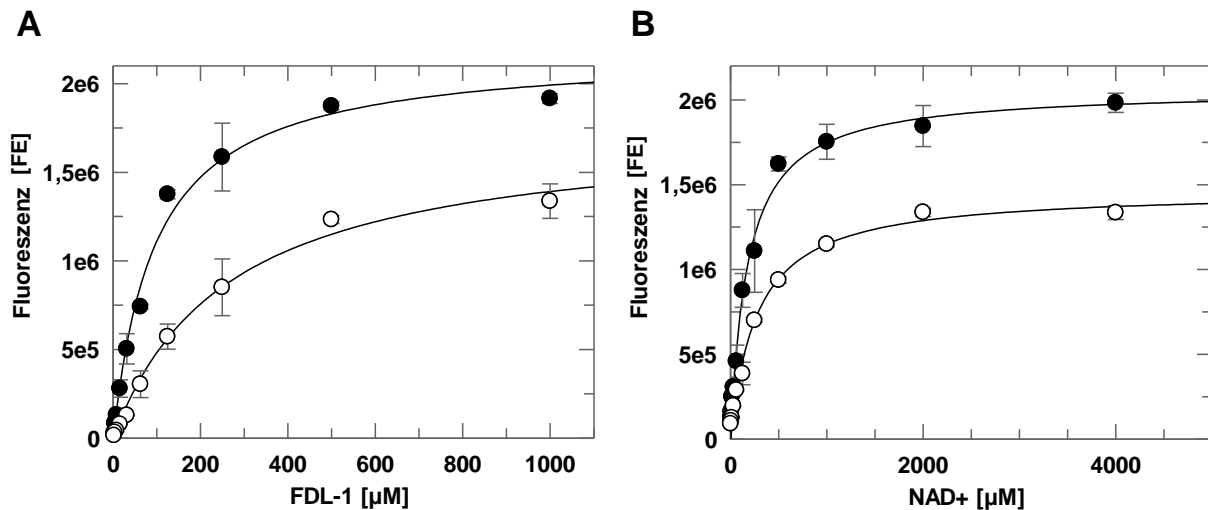


Abbildung 25 AROS konkurriert mit dem acetylierten Peptid-Substrat. (A) Aktivitätstest bei verschiedenen FDL-1-Konzentrationen zeigte einen dreifach höheren K_m in Anwesenheit von AROS und eine minimale Verringerung des v_{max} . Die Reaktion erfolgte mit $\pm 40 \mu\text{M}$ AROS, 3 mM NAD⁺, 1 μM Sirt1 bei 37 °C. (B) Aktivitätstest bei verschiedenen NAD⁺-Konzentrationen zeigte einen leicht (1,5-fach) höheren K_m in Anwesenheit von AROS und eine geringe Verringerung des v_{max} . Die Reaktion erfolgte mit $\pm 40 \mu\text{M}$ AROS, 0,6 mM FDL-1, 1 μM Sirt1 bei 37 °C.

3.4.3 Analyse der Interaktionsfläche des Sirt1/AROS-Komplexes

Nachdem eine AROS abhängige Inhibition mit einem IC_{50} -Wert im mikromolaren Bereich nachgewiesen werden konnte, sollten die molekularen Grundlagen dieser Interaktion untersucht werden. Bisherige Studien hinsichtlich der Interaktionsfläche von Sirt1 kamen zu dem Resultat, dass die Aminosäuren 114-217 von Sirt1 ausreichend für die Interaktion mit AROS sind. Dieser Bereich befindet sich außerhalb der katalytischen Domäne und liegt zum Teil in der regulatorischen SBD (*STAC binding domain* umfasst Aminosäuren 183 bis 229). Zur strukturellen Charakterisierung des Proteinkomplexes wurden Kristallisationsversuche durchgeführt. Diese resultierten trotz der Stabilisierung des Sirt1/AROS-Komplexes durch Optimierung des Puffersystems nicht in Kristallen des Komplexes.

Um weitere Einblicke in die Interaktion von Sirt1 mit AROS zu erhalten, wurden NMR-Messungen durchgeführt. Dazu wurde das verkürzte Sirt1-Konstrukt verwendet. Das miniSirt1ex687 mit der SBD, der katalytischen Domäne sowie der regulatorischen ESA-Region (*essential for sirtuin activity*, ESA) beinhaltet entsprechend der IC_{50} -Bestimmung alle Bereiche, die zur Bildung eines funktionalen Enzym/Inhibitor-Komplexes essentiell sind. Um die Interaktionsfläche in AROS zu bestimmen, wurden

[^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektren von AROS mit verschiedenen Konzentrationen des Interaktionspartners miniSirt1ex687 aufgenommen. Wird bei diesen Titrationen ein Proteinkomplex gebildet, ändern sich mehrere physikalische Parameter der jeweiligen Interaktionspartner. So kommt es zu einer Veränderung der lokalen Elektronendichte durch z.B. Unterschiede in der Hydrophobizität der Interaktionsfläche. Dies hat Auswirkungen auf die chemische Verschiebung und resultiert in einer Signaländerung der an der Interaktion beteiligten Aminosäurereste¹⁶⁸. Die Abbildung 26A zeigt die Überlagerung der 2D [^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektren von AROS alleine sowie von AROS mit miniSirt1ex687. Bereits bei einem Verhältnis von 2:1 AROS zu Sirt1 ist eine signifikante Änderung im AROS-Spektrum zu erkennen, welche sich bei einem Verhältnis der beiden Proteine von 1:1 noch verstärkt. Die Überlagerung der Spektren der Titrationen zeigen sowohl Signale, welche sich ändern als auch Signale, die unverändert bleiben. Daraus kann geschlossen werden, dass nur ein Teil der Aminosäuren von AROS an der Sirt1-Bindung beteiligt ist. Es handelt sich folglich um eine spezifische Interaktion von AROS mit Sirt1. Die Signalintensitäten der Aminosäuren, welche an der Bindung beteiligt sind, nahmen mit steigender Sirt1-Konzentration ab und sind aufgrund von Linienverbreiterung in dem gebundenen Zustand nicht mehr detektierbar. Die betroffenen Signale befinden sich in einem intermediären Zustand des chemischen Austausches, welcher typisch für Proteinkomplexe mit Affinitäten im mikromolaren Bereich¹⁶⁹.

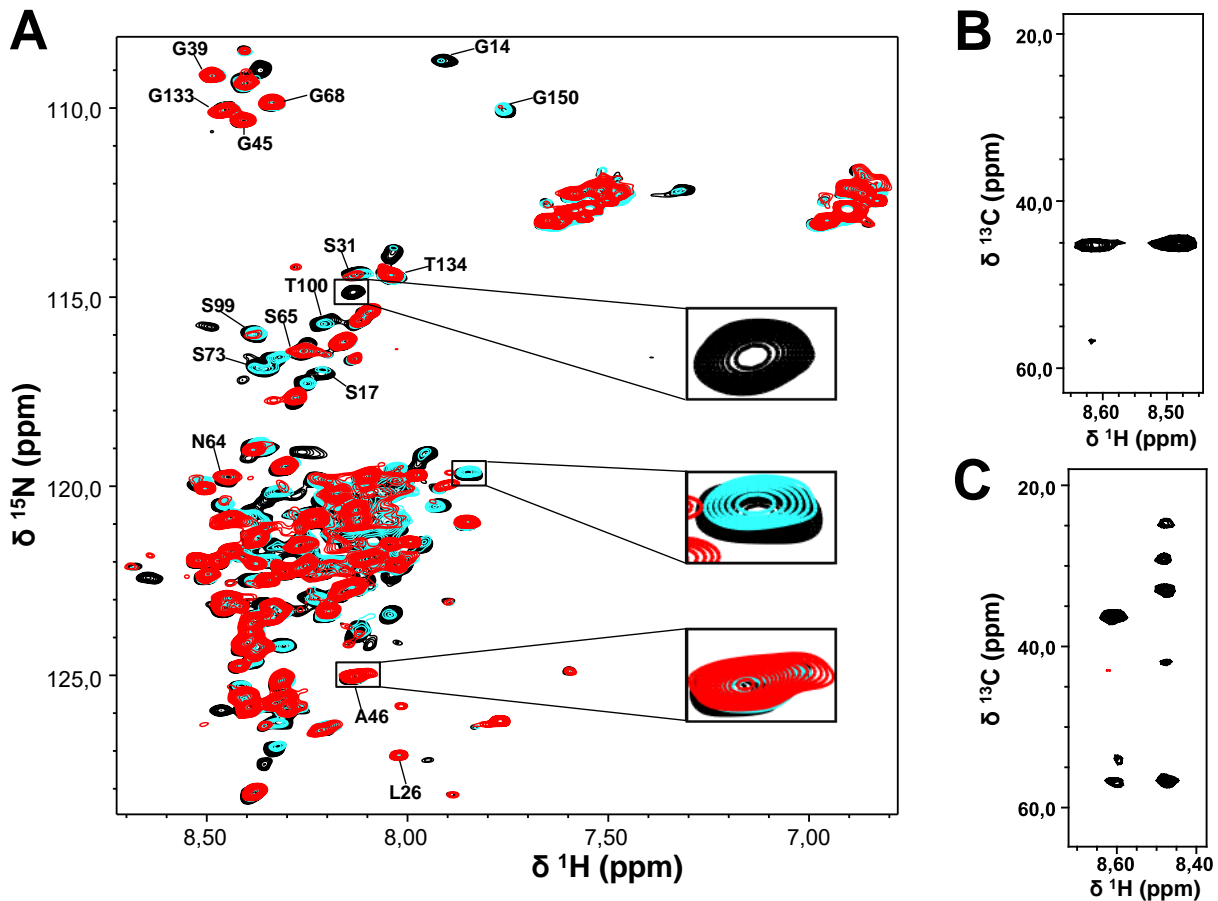


Abbildung 26 2D-NMR-Titration zeigt Interaktion von AROS mit Sirt1. (A) Überlagerung der $[^1\text{H},^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren der Titration von $150\ \mu\text{M}$ ^{15}N -markiertem His₆-AROS mit Sirt1. Molare Verhältnisse AROS zu Sirt1: 1:0 (Schwarz), 1:0,5 (Cyan), 1:1 (Rot). Die Messung erfolgte bei $25\ ^\circ\text{C}$ in $50\ \text{mM Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, $300\ \text{mM NaCl}$ und $150\ \text{mM L-Arginin}$ bei pH 6,5. (B) Ausschnitt des CBCANH/ HNCACB-Spektrums von AROS bei $110\ \text{ppm}$ in der ^{15}N -Dimension. (C) Ausschnitt des CC(CO)NH-Spektrums von AROS bei $110\ \text{ppm}$ in der ^{15}N -Dimension. Die Messung der Spektren aus B und C erfolgte bei $5\ ^\circ\text{C}$ in $50\ \text{mM Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, $300\ \text{mM NaCl}$ und $150\ \text{mM L-Arginin}$ bei pH 6,5.

Nachdem aus den $[^1\text{H},^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren die interagierenden Bereiche identifiziert werden konnten, sollten als nächstes die Signale den Aminosäuren innerhalb der AROS-Sequenz zugeordnet werden. AROS musste dazu in ausreichender Menge in Minimalmedium mit ^{15}N und ^{13}C angereicherten Isotopen exprimiert und anschließend gereinigt werden. Mit der entsprechenden Probe wurden HNCA-, CBCANH/ HNCACB- sowie CBCA(CO)NH/ HN(CO)CACB- und CC(CO)NH-Spektren aufgenommen. In Folge der hohen AROS-Konzentration ($300\ \mu\text{M}$), die für die Messung notwendig war und der langen Messzeiten der Spektren, kam es zu Stabilitätsproblemen und die Qualität der Spektren ermöglichte nur eine teilweise Zuordnung. Einige Signale

konnten eindeutig zugeordnet werden. So zeigen die Signale bei 8,48 bzw. 8,6 ppm in der ^1H -Dimension und 110 ppm in der ^{15}N -Dimension eine chemische Verschiebung der ^{13}C -Dimension von 45 ppm für C α in dem CBCANH/ HNCACB-Spektrum (Abbildung 26B). Dieser Wert entspricht Glycinen. Das CC(CO)NH-Spektrum zeigt die chemischen Verschiebungen aller Seitenketten-Kohlenstoffkerne der Vorgänger-Aminosäure. Für die beiden Glycine, sind in der ^{13}C -Dimension die chemischen Verschiebungen von Glutaminsäure und Lysin zu erkennen (Abbildung 26C). Da die Kombination aus EG und KG nur jeweils einmal in der Sequenz von AROS zu finden ist, konnten die Glycine eindeutig zugeordnet werden. Durch dieses Vorgehen wurden ca. 10 % von AROS zugeordnet. Weitere Aminosäure-Kombinationen wie z.B. PR konnten identifiziert werden. Diese Kombination ist insgesamt dreimal in AROS zu finden und konnte dementsprechend nicht zugeordnet werden. Da allerdings alle drei Arginine in der Überlagerung der Titrationsspektren von Sirt1 und AROS keine Signaländerung zeigen, kann eine Beteiligung dieser Aminosäuren an der Interaktion ausgeschlossen werden. Auf diese Weise wurden alle Signale ausgewertet. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass der N-Terminus mit den Aminosäuren 1-18 sowie der mittlere Teil der Aminosäuren 57 bis 89 und der C-Terminus an der Interaktion mit Sirt1 beteiligt sind.

Um weitere Informationen zur Interaktionsfläche von Sirt1 und AROS zu erhalten, wurden Fragmente der beiden Proteine hergestellt und die IC₅₀-Werte mittels FDL-Aktivitätstest bestimmt. Die Konstrukte mit reduzierten N- bzw. C-Terminus führten im Vergleich zum Volllänge Protein zu einem geringeren Inhibitions Potenzial, erkennbar an den höheren IC₅₀-Werten (Tabelle 17). Das N- und C-terminal verkürzte AROS-Protein zeigte zwar eine inhibitorische Wirkung auf Sirt1 aber resultierte, verglichen mit dem Volllängeprotein, in einem sechsfach höheren IC₅₀-Wert.

Tabelle 17: IC₅₀-Werte verschiedener AROS-Fragmente gemessen mittels FDL-Aktivitätstest.

AROS-Konstrukt	IC ₅₀ [μM]
AROS 1-136	19 ± 1
AROS 39-136	39 ± 3
AROS 1-89	51 ± 2
AROS 55-108	117 ± 6

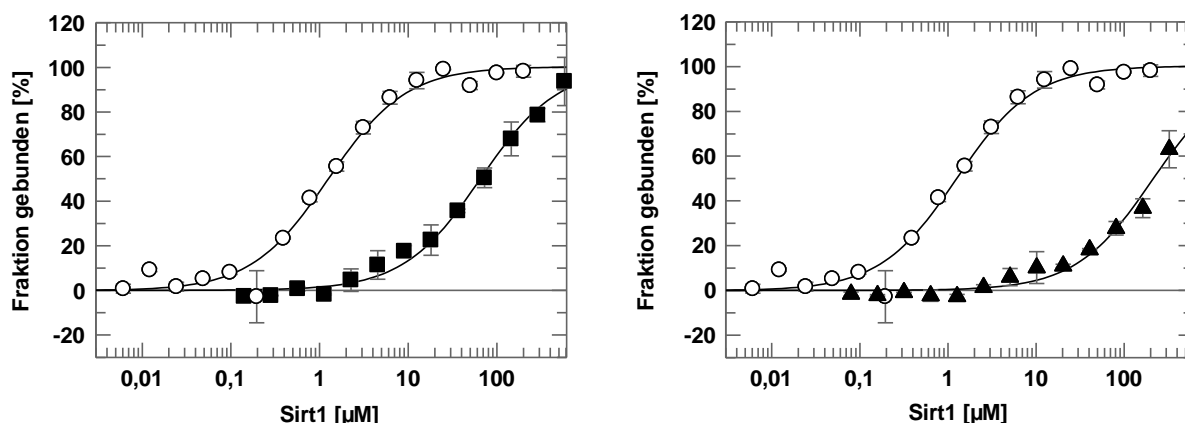


Abbildung 27: Verkürzte Konstrukte von AROS und Sirt1 schwächen die Affinität des Proteinkomplexes. (A) MST Messung mit fluoreszenzmarkiertem miniSirt1ex687 (150 nM) und His₆-AROS 1-136 (Weiß) bzw. His₆-AROS 1-89 (Schwarz). (B) MST Messung mit fluoreszenzmarkiertem miniSirt1ex687 (150 nM) und His₆-AROS 1-136 (Weiß) bzw. fluoreszenzmarkiertem Sirt1 144-230 (150 nM) und His₆-AROS 1-136 (Schwarz).

Tabelle 18: K_D -Werte der Interaktion von His₆-AROS-Konstrukten mit verschiedenen Sirt1-Konstrukten gemessen mittels MST.

Sirt1-Konstrukt	AROS-Konstrukt	K_D [μM]
miniSirt1ex687	AROS 1-136	$1,3 \pm 0,2$
miniSirt1ex687	AROS 1-89	$65,1 \pm 9,1$
Sirt1 144-230	AROS 1-89	$209,3 \pm 67,3$

Die Affinitäten der Interaktion von AROS und Sirt1 wurden mit Hilfe von mikroskalierbarer Thermophorese (MST) ermittelt. Dazu wurde Sirt1 fluoreszenzmarkiert und AROS titriert. Mit dieser Methode kann die Stärke der Interaktion zwischen zwei Proteinen gemessen werden. Dabei wird die Änderung der Fluoreszenz in Folge einer Infrarot-Laser-induzierten Temperaturänderung erkannt. Der Bereich der Fluoreszenzänderung korreliert mit der Bindung eines Interaktionspartners an das fluoreszierende Protein.

Das Volllänge AROS bindet miniSirt1ex687 mit einem K_D von $1,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (Abbildung 27A). Der korrespondierende IC_{50} ($19 \pm 0,2 \mu\text{M}$) überstieg diesen Wert um das 15-fache und spricht wie auch die Ergebnisse der Kinetik-Messungen für eine Konkurrenz zwischen AROS und dem acetylierten Substrat. Eine Bindungsmessung mit dem

C-terminal verkürzten AROS-Konstrukt zeigt eine Bindung zum Sirt1 mit einem 50-fach höheren K_D verglichen mit dem Volllängeprotein (Abbildung 27A, Tabelle 18). Da die AROS-Fragmente im Vergleich zum Volllängeprotein in einem geringeren Inhibitions Potenzial sowie in schwächeren Affinitäten resultierten, scheinen N- und C-Terminus von AROS einen Einfluss auf die Sirt1-Inhibition zu haben.

Die Reduktion des Sirt1 auf die SBD führte zu einer weiteren Abschwächung der Affinität des Proteinkomplexes. Um die Interaktionsfläche in Sirt1 genauer zu untersuchen, wurden erneut $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren von AROS mit verschiedenen Sirt1-Konstrukten gemessen. Dabei zeigt sich in der Überlagerung mit der SBD, dass Signale verschwinden und somit ein Teil von AROS mit der SBD interagiert (Abbildung 28A). Die Überlagerung mit einem Sirt1-Konstrukt, bei dem die SBD fehlte, zeigte ebenso Signalveränderungen (Abbildung 26B). AROS bindet dementsprechend an die katalytische Domäne von Sirt1 und die SBD. Folglich ist entgegen der bisherigen Annahme die Interaktion nicht ausschließlich auf eine Bindung mit der SBD zurückzuführen. NMR-Messungen mit einem Sirt1-Konstrukt ohne die ESA-Region sind mit den Messungen des vollständigen miniSirt1ex687 vergleichbar (Abbildung 26C). Daher ist nicht von einer Beteiligung der ESA-Region an der Komplexbildung auszugehen.

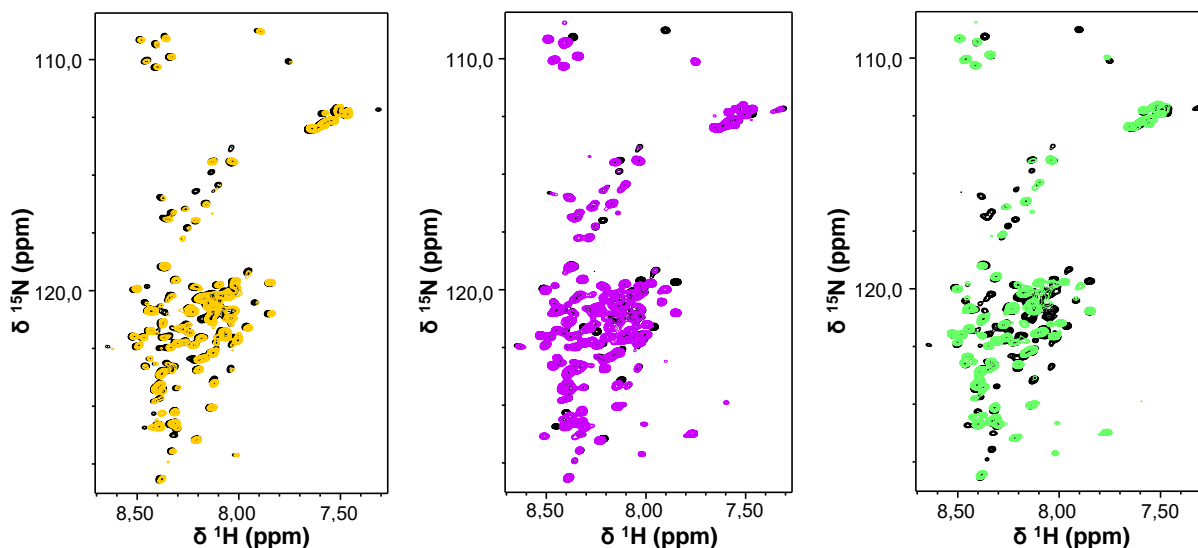


Abbildung 28: 2D-NMR-Experimente zeigen AROS-Interaktion mit der SBD sowie dem generischen, katalytischen Sirt1-Kern. Überlagerung der $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren der Titration von $150\ \mu\text{M}\ ^{15}\text{N}\ \text{His}_6\text{-AROS}$ (Schwarz) mit je $150\ \mu\text{M}$ der SBD (A, Gelb), $150\ \mu\text{M}\ \Delta\text{SBDminiSirt1}$ (B, Magenta) und $150\ \mu\text{M}\ \Delta\text{ESAmiSirt1}$ (C, Grün). Die Messungen erfolgten bei $20\ ^\circ\text{C}$ in $50\ \text{mM}\ \text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, $300\ \text{mM}\ \text{NaCl}$ und $150\ \text{mM}\ \text{L-Arginin}$ bei pH 6,5.

Um einen detaillierteren Einblick über die für die Bindung essenziellen Proteinbereiche von AROS zu erhalten, wurden aufbauend auf den bisherigen Daten verschiedene Peptide konzipiert und mittels MST Affinitäten zu Sirt1 bestimmt (Tabelle 19). Insbesondere der mittlere Bereich in AROS mit den Aminosäuren 62-71 scheint wichtig für die Bindung mit Sirt1 zu sein. Des Weiteren ergab die Messung mit der SBD einen zweifach größeren K_D -Wert als mit dem miniSirt1ex687. Die K_D -Werte lassen vermuten, dass die Interaktion dabei teilweise über die SBD erfolgt aber auch andere Sirt1-Bereiche involviert sind. Die anderen AROS-Peptide interagieren ebenfalls mit Sirt1, allerdings mit einer geringeren Affinität.

Tabelle 19: K_D -Werte der Interaktionen verschiedener AROS-Peptide mit Sirt1-Konstrukten gemessen mittels MST.

Sirt1-Konstrukt	AROS-Konstrukt	K_D [μ M]
AROS 62-71	miniSirt1ex687	85,7 \pm 15,7
AROS 62-71	Sirt1 144-230	166 \pm 24
AROS 80-91	miniSirt1ex687	721 \pm 310
AROS 80-91	Sirt1 144-230	579 \pm 102
AROS 96-109	miniSirt1ex687	151 \pm 31

Ergänzend zu den Aktivitätstests, Bindungsstudien und NMR-Daten wurden chemische Quervernetzungsreaktionen mit AROS-Konstrukten und miniSirt1ex687 durchgeführt. Hierzu wurde das Quervernetzungsreagenz Disuccinimidylsulfoxid (DSSO) verwendet. Dessen N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Estergruppe reagiert mit den Lysin-Aminogruppen der Proteine. Dabei wird die NHS-Gruppe abgespalten und eine stabile Amidbindung entsteht. In Proteinkomplexen, dessen Lysine sich in räumlicher Nähe (12,5 Å) zueinander befinden, kann sich zwischen den beiden Interaktionspartnern eine kovalente Bindung ausbilden. Durch anschließende massenspektrometrische Analyse lässt sich ermittelt, welche Proteinregionen in Nachbarschaft zueinander liegen.

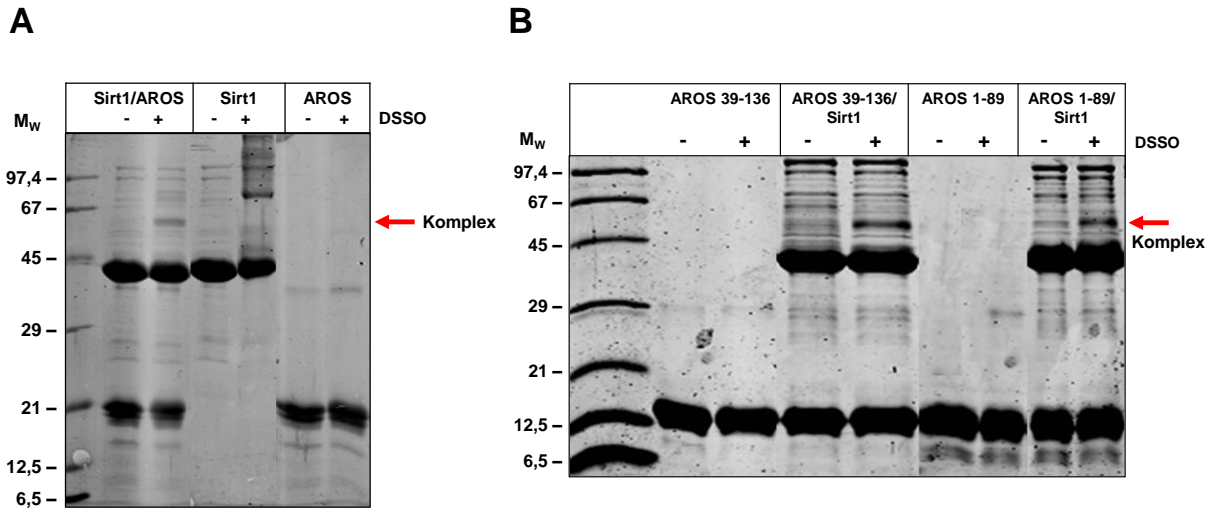


Abbildung 29: Quervernetzungsexperimente zeigen Komplexbildung von Sirt1 mit AROS. Je 50 µM Volllänge AROS (**A**) oder verkürzte AROS-Proteine (**B**) reagierten mit 50 µM miniSirt1ex687 in 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,0 und 250 mM NaCl mit 0,5 mM DSSO für 10 min bei 20 °C. Die Reaktion wurde mit 1 M Tris abgestoppt. Die roten Pfeile zeigen die Bande des Sirt1/AROS-Komplex.

Polyacrylamidgele der Abbildung 29 stellen die Quervernetzungsreaktionen vor Zugabe von DSSO und nach 10 min Reaktionszeit dar. Die Kombination aus Sirtuin und AROS zeigt nach Zugabe von DSSO die Bildung einer potenziellen Komplexbande sowohl für Volllänge (Molekulargewicht entspricht 58 kDa) als auch für die Fragmente (Molekulargewicht entspricht 54-56 kDa). In den Negativkontrollen des jeweiligen Interaktionspartners waren keine Komplexbanden bei den entsprechenden Molekulargewichten zu erkennen. Mit Hilfe der anschließenden massenspektrometrischen Analyse der potenziellen Komplexbande aus Volllänge AROS und Sirt1 konnte ein quervernetztes Peptid bestehend aus AROS- und Sirtuinsequenz nachgewiesen und die Komplexbildung bestätigt werden. Die Identifizierung der Peptide ergab, dass es sich um die Bereiche K(238)DINTIEDAVK(248) in Sirt1 sowie K(102)ACDRPVAK(110) in AROS handelt. Dabei erfolgt eine kovalente Bindung zwischen dem Sirt1-Lysin 238 und dem AROS-Lysin 102. Demzufolge befindet sich der Interaktionsbereich im Sirtuin am Übergang der SBD zur katalytischen Domäne.

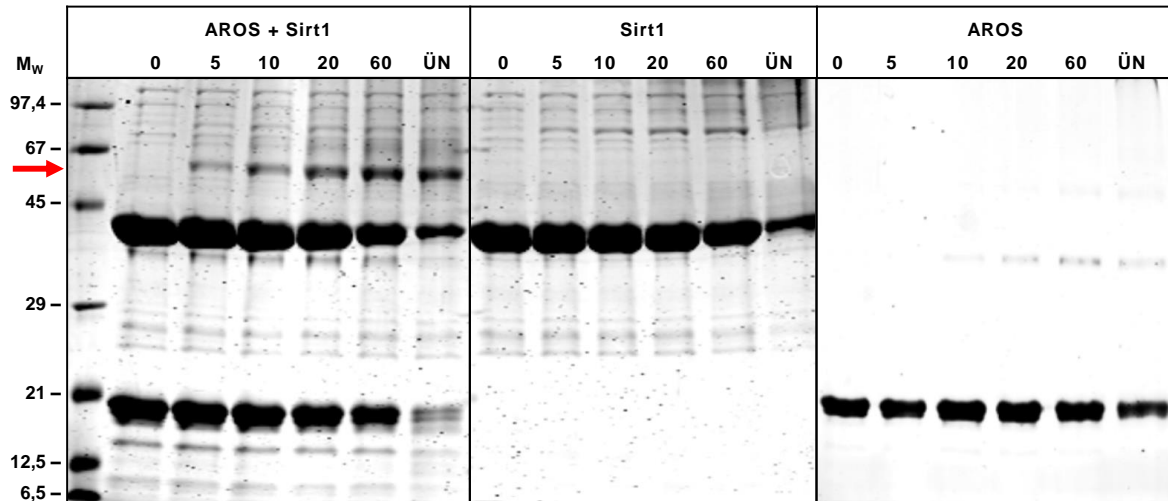


Abbildung 30: Quervernetzungsexperimente mit Glutaraldehyd zeigen Komplexbildung von Sirt1 mit AROS. Je 50 μM AROS und miniSirt1ex687 reagierten in 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7,0 und 250 mM NaCl mit 0,002 % Glutaraldehyd bei 20 °C. Die Reaktion wurde mit 1 M Tris abgestoppt. Der rote Pfeil zeigt die Bande des Sirt1/AROS-Komplex.

Um einen quervernetzten, stabilisierten Komplex für Kristallisationsversuche im präparativen Maßstab herzustellen, wurde das Quervernetzungsreagenz Glutaraldehyd verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Carbonylreagenz, dass Amine über die Mannich-Reaktionen und/oder reduktive Aminierung kondensiert. Glutaraldehyd verbindet Lysinreste, welche einen Abstand von 5 Å zueinander haben. Auch mit Hilfe dieser Verbindung wurde eine Komplexbildung mit SDS-PAGE beobachtet. Mit zunehmender Zeit konnte eine deutliche Zunahme der Bande im Bereich des Proteinkomplexes aus Volllänge AROS und miniSirt1ex687 (58 kDa) beobachtet werden. Zwar war die Quervernetzung des Proteinkomplexes aufgrund von Aggregationsproblemen mit dem Glutaraldehyd im präparativen Maßstab nicht möglich, jedoch konnte auch mit diesem Quervernetzungsreagenz die Komplexbildung nachgewiesen werden.

3.4.4 Regulation der Sirt1/AROS-Interaktion durch PTMs

Eine C-terminale Phosphorylierung außerhalb der katalytischen Domäne an Serin 682 soll die Interaktion zu AROS abschwächen¹²⁵. Um diesen potenziellen regulatorischen Einfluss durch eine PTM zu untersuchen, wurde ein Phosphomimickry (S682E) des miniSirt1ex687 hergestellt und der Einfluss von AROS auf dessen Deacetylaseaktivität untersucht. Wie in Abbildung 31 zu sehen ist, hat die „Phosphorylierung“ des Sirtuins keinen Einfluss auf dessen Aktivität. Nach Zugabe von 100 μM AROS kommt es zu

keinem signifikanten Unterschied in der inhibitorischen Wirkung zwischen dem pseudophosphorylierten und dem Wildtypprotein. Dem zur Folge konnte kein Einfluss der Sirt1-Phosphorylierung durch die Verwendung der Phosphomimickry-Variante (S682E) auf die Interaktion mit AROS nachgewiesen werden.

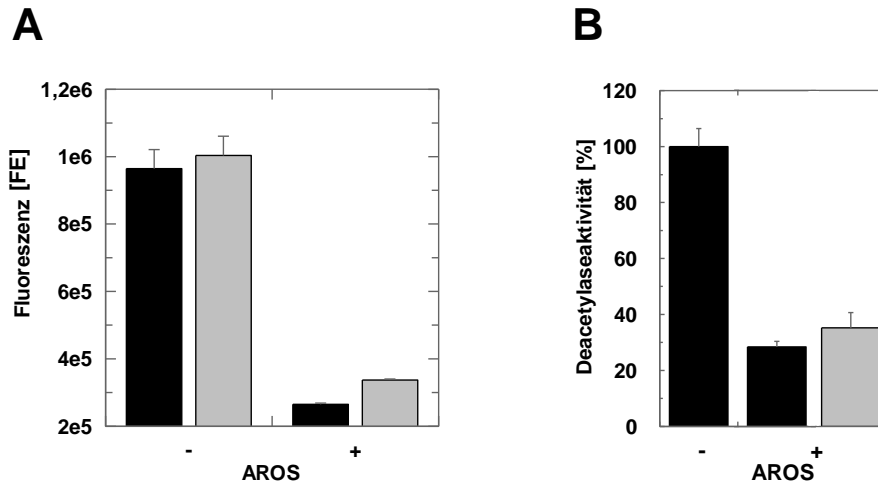


Abbildung 31: Aktivitätstest mit verschiedenen Phosphomimickry-Varianten zeigen keinen Einfluss der Phosphorylierung auf die Sirt1-Inhibition durch AROS. (A) Aktivitätstest mit 100 µM FDL-1, 1 µM miniSirt1ex687 (Schwarz) bzw. 1 µM miniSirt1ex687S682E (Grau), 0,5 mM NAD in An- und Abwesenheit von 100 µM AROS in 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,0 bei 37 °C. (B) Aktivitätstest mit 100 µM FDL-1, 1 µM miniSirt1ex687, 0,5 mM NAD in An- und Abwesenheit von 100 µM AROS (Schwarz) bzw. AROSS84D (Grau) in 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,0 bei 37 °C.

Für AROS sind bisher keine PTMs bekannt, welche die Interaktion mit Sirt1 regulieren. Bisher wurden auch noch keine PTMs von AROS charakterisiert. In der Uniprot-Datenbank gibt es lediglich den Hinweis einer Phosphorylierung des Serins 84 von AROS, welche durch Untersuchungen des Phosphoproteoms humaner Krebszellen entdeckt wurde. Die Phosphorylierung dieses Serins wurde ebenfalls mit Hilfe eines Phosphomimickry (S84D) auf den Einfluss der inhibitorischen Wirkung untersucht. Die Ergebnisse des FDL-Aktivitätstests zeigen nach Zugabe von AROS keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Inhibition (Abbildung 31B). Folglich ist nicht davon auszugehen, dass eine Phosphorylierung am Serin 84 die Komplexbildung beeinflusst.

3.4.5 Spezifität Isoformen

Den Ergebnissen von Kim *et al.* folgend, handelt es sich um eine isoformspezifische Interaktion von AROS zu Sirt1. Eine Bindung zu den Isoformen Sirt2-7 konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Da entsprechend der bisherigen Ergebnisse die Sirt1-

Bindung von AROS zum Teil über den generischen, katalytischen Sirtuin-Kern erfolgt, wurde die Isoform-Spezifität der AROS-abhängigen Inhibition getestet.

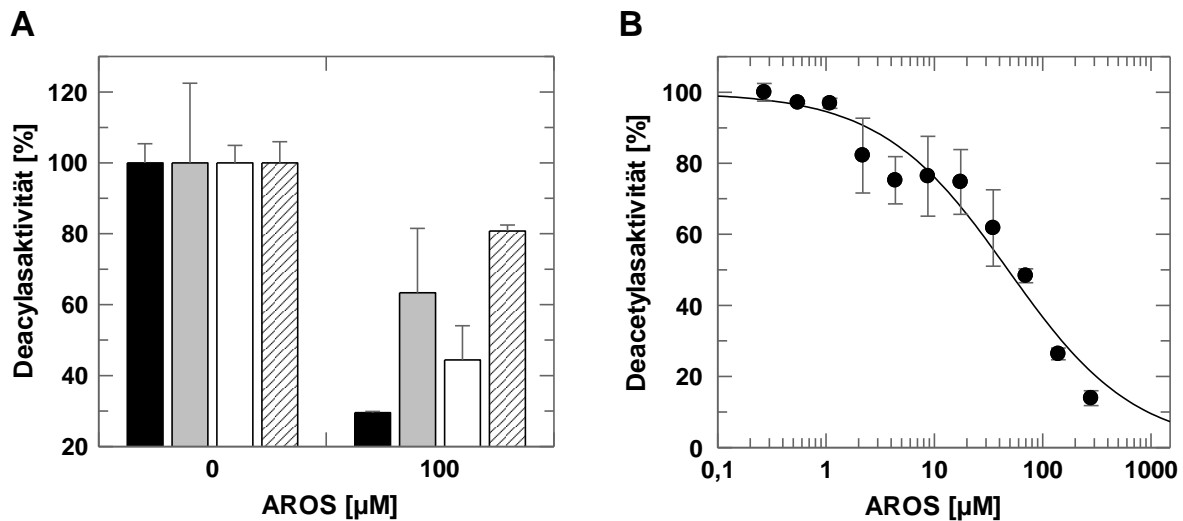


Abbildung 32: AROS inhibiert die Deacetylaseaktivität von Sirt1-3 und 5. (A) Aktivitätstest mit 100 μM FDL-1 bzw. succinyliertes FDL, je 1 μM Sirtuin (Sirt1: Schwarz; Sirt2: Grau; Sirt3: Weiß; Sirt5: gestreift), 0,5 mM NAD in An- und Abwesenheit von 100 μM AROS in 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,0 bei 37 °C. (B) Aktivitätstest zu IC₅₀-Bestimmung mit 100 μM FDL-1, 1 μM Sirt3 bei verschiedenen AROS-Konzentrationen in 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,0 bei 37 °C.

Die FDL-Aktivitätstests zeigen, dass die Deacetylaseaktivität von Sirt1, Sirt2, Sirt3 bzw. die Desuccinylaseaktivität von Sirt5 in Anwesenheit von 100 μM AROS inhibiert wurde (Abbildung 32A). Hierbei traten Unterschiede in der Stärke der Inhibition auf. Im Gegensatz zur starken Inhibition von Sirt1 wurden Sirt2 und Sirt5 nur schwach inhibiert. Die Aktivität von Sirt3 wurde in einem mittleren Maße gehemmt. Eine IC₅₀-Bestimmung für Sirt3 ergab einen Wert von 48 ± 7 μM (Abbildung 32B). Verglichen mit Volllänge-Sirt1 ist dieser IC₅₀ um das 4,4-fache (2,6-fach im Vergleich zu miniSirt1ex687) erhöht. Daraus kann geschlossen werden, dass sich die für die AROS-vermittelte Inhibition essenziellen Bereiche in dem generischen, katalytischen Kern der Sirtuine befinden und andere Isoformen für strukturelle sowie mechanistische Studien genutzt werden können.

Mit Hilfe von Quervernetzungsexperimenten wurde die Komplexbildung von AROS mit Sirt2, Sirt3 und Sirt5 überprüft und anschließend mit Massenspektrometrie analysiert. Nach Zugabe von DSSO war die Bildung einer Komplexbande in Höhe von ca. 50 kDa für diese Sirtuinisoformen zu erkennen (Abbildung 33). Des Weiteren zeigt die Kontrollreaktionen ohne AROS für alle drei Isoformen eine zusätzliche Bande, die dem

Molekulargewicht eines Dimers entspricht. Im Reaktionsansatz mit AROS ist die potenzielle Dimerbande der jeweiligen Isoform weniger intensiv. Daher scheint die Dimerbildung nach Zugabe der Quervernetzungsverbindung durch die Komplexbildung mit AROS reduziert zu werden. Mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse konnten für Sirt5 und AROS quervernetzte Peptide gefunden werden. Für Sirt5 konnten quervernetzte Peptide im Bereich der zinkbindenden Domäne (Lysin 79) sowie dem Übergangsbereich zur katalytischen Domäne (Lysin 112) identifiziert werden. Verschiedene AROS-Peptide (Lysine 46, 57, 102 und 112) wurden entsprechend der massenspektrometrischen Analyse mit diesen Sirt5-Lysinen verknüpft. Die massenspektrometrische Analyse der AROS-Peptide erwies sich allerdings als schwierig und die Identifizierung dieser Peptide ist nicht eindeutig. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der Quervernetzungsexperimente mit Sirt2,3 und 5 die AROS-Komplexbildung mit anderen Sirtuinisoformen und bestätigen damit die Erkenntnisse der Aktivitätstest.

Tabelle 20: Die Molekulargewichte von AROS, Sirt2, 3 und 5 sowie die Molekulargewichte der jeweiligen Sirtuin/AROS-Komplexe.

Konstrukt	Molekulargewicht [kDa]	Molekulargewicht Komplex [kDa]
AROS 1-136	17,3	-
Sirt3 118-390	31,2	48,5
Sirt5 34-302	29,9	47,2
Sirt2 55-356	34,5	51,8

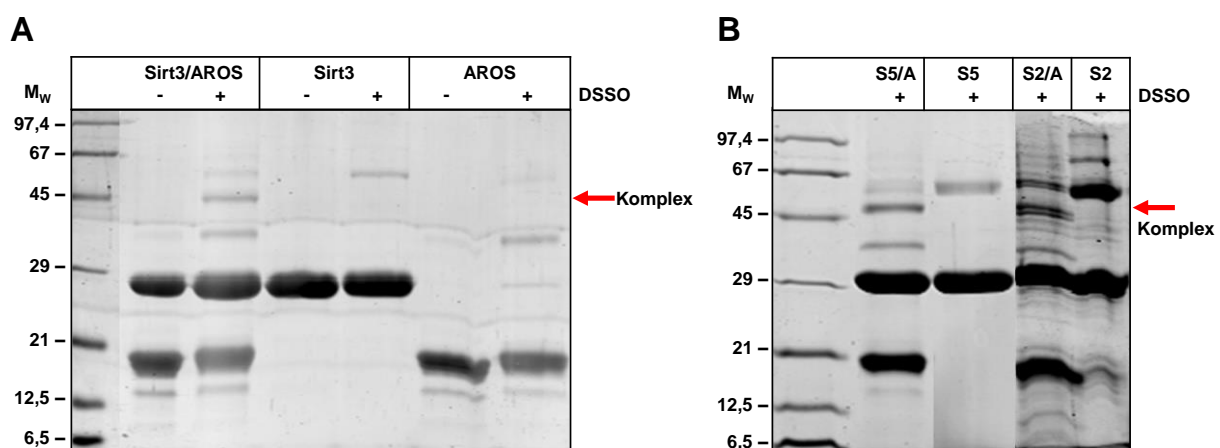


Abbildung 33: Quervernetzungsexperimente zeigen Komplexbildung von Sirt2, 3 und 5 mit AROS. Je 50 µM AROS reagierten mit 50 µM Sirt 3 (A) oder Sirt2 bzw. Sirt5 (B) in 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,0 und 250 mM NaCl mit 0,5 mM DSSO für 10 min bei 20 °C. Die Reaktion wurde mit 1 M Tris abgestoppt. Die roten Pfeile zeigen die Bande des Sirtuin/AROS-Komplex.

Da die massenspektrometrische Analyse der DSSO-quervernetzten Komplexe in keiner eindeutigen Kartierung der Interaktionsfläche resultierte, wurde die Bindung von AROS mit anderen Sirtuinisoformen mit Hilfe von NMR untersucht. Aufgrund der Tatsache, dass Sirt3 im Vergleich zu Sirt2 und 5 die stärkste AROS-vermittelte Inhibition zeigte, wurde diese Isoform zu ^{15}N -markiertem AROS titriert. Die Überlagerung der HSQC-Spektren von AROS mit und ohne Sirt3 (Abbildung 34) zeigt die Interaktion der beiden Proteine. Wie bereits bei der Sirt1/AROS-Interaktion beobachtet, verschwinden auch nach der Zugabe von Sirt3 in Folge der Linienverbreiterung und der damit einhergehenden Intensitätsverringering bis unterhalb der Detektierbarkeit einige Signale. Hierbei handelt es sich um die gleichen Signale. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass die gleichen Aminosäuren von AROS an der Sirtuininteraktion beteiligt sind und AROS mit den verschiedenen Isoformen in gleicher Weise interagiert.

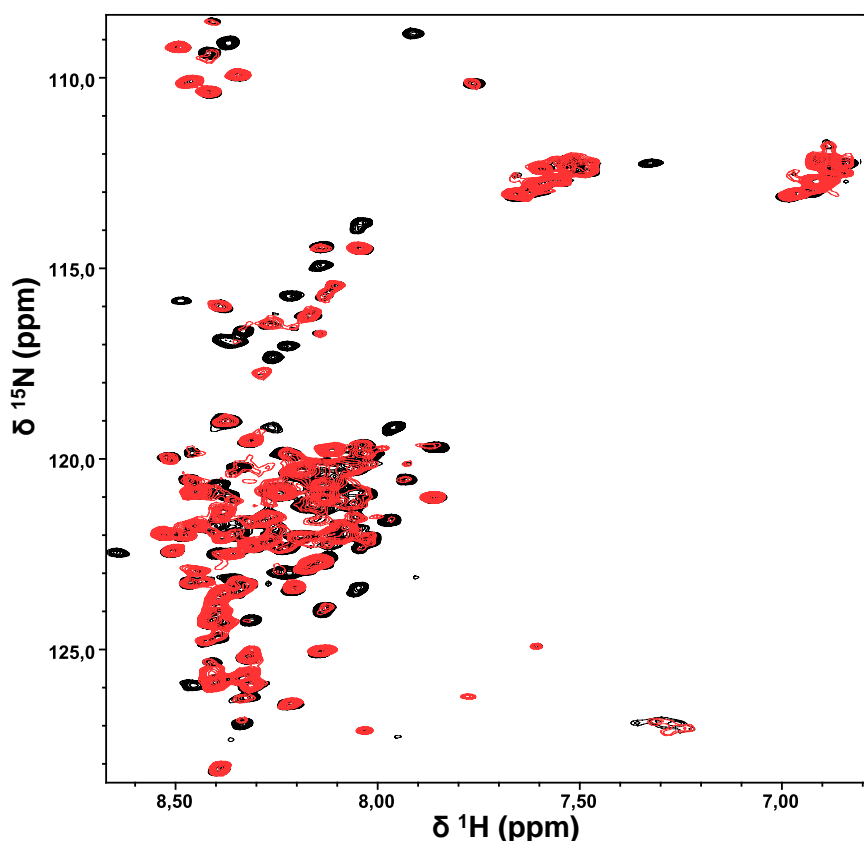


Abbildung 34 2D-NMR-Titration zeigt Interaktion von AROS mit Sirt3. Überlagerung der $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren der Titration von $150\ \mu\text{M}$ ^{15}N AROS mit Sirt3. Molare Verhältnisse AROS zu Sirt3: 1:0 (Schwarz) und 1:1 (Rot). Die Messung erfolgte bei $20\ ^\circ\text{C}$ in $50\ \text{mM}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, $300\ \text{mM}$ NaCl und $150\ \text{mM}$ L-Arginin bei pH 6,5.

Um einen detaillierteren, strukturellen Einblick in die Sirtuin/AROS-Interaktion zu erhalten, wurden Kristallisationsversuche mit Sirt3 und AROS-Peptiden durchgeführt. Kokristallisationsansätze mit Sirt3 und dem AROS-Peptid 62-71 resultierten in Kristallen (Abbildung 35B). Mit Hilfe dieser Kristalle konnte eine Sirt3/AROS-Struktur mit einer Auflösung von 3,27 Å gelöst werden. Das Strukturmodell wurde zu einem R-Faktor von 19 % und einem freien R-Faktor von 25,2 % verfeinert (Tabelle 21).

Tabelle 21 Aufnahme der Diffraktionsdaten des Sirt3/AROS-Komplexes sowie Statistik der Verfeinerung des Models.

Datensammlung		
Raumgruppe		P3 ₂ 21
Zellkonstanten		a=b=110,2 Å; c=344,4 Å α=β=90 °, γ=120 °
Auflösung (Å) ^a		49,19-3,27 (3,38-3,27)
R _{merge} ^a		0,316 (3,191)
CC _{1/2} ^a (%)		99,7 (33,9)
Intensität über Sigma ^a (I)		7,9 (0,7)
Vollständigkeit (%) ^a		99,7 (98,7)
Redundanz ^a		10,9 (10,8)
Verfeinerung		
Auflösungsbereich (Å)		49,19-3,27 (3,387-3,27)
Gemessene Reflexe		38478
R-Faktor / R _{free} -Faktor (%)		19/25,2
Anzahl der Atome	Protein	1691
	Wasser	23
B-Faktoren (Å ²)	Protein	98,32
	Wasser	86,51
R.m.s. Abweichungen von Idealwerten	Bindungslängen (Å)	0,011
	Bindungswinkel (°)	1,38

a: Werte der äußersten Schale.

Wie bereits für die Strukturen des Fragmentscreening beobachtet werden konnte, weist auch diese Sirt3-Struktur sechs Monomere in einer asymmetrischen Einheit auf. Allerdings kristallisierte Sirt3 in Anwesenheit von AROS in einer anderen Raumgruppe. Die Elektronendichte zeigt deutlich das gebundene AROS-Peptid in der Bindungsstelle des Substratpeptides (Abbildung 35A). Das Lysin 65 von AROS befindet sich dabei im

aktiven Zentrum von Sirt3 (Abbildung 35C). In allen sechs Monomeren ist in der $2F_o - F_c$ -Dichte eine Elektronendichte für das gebundene AROS-Peptid vorzufinden, wobei sie für die Kette B am besten definiert ist. Insbesondere das Lysin 65 mit dem C-terminalen Arginin ist klar definiert. Ausgehend von dem Lysin sind N-terminal zwei und C-terminal drei Reste sichtbar (Reste 63-68). Die Reste am Ende des Peptides sind scheinbar sehr flexibel (Rest 62 und Reste 69-71). Der Sauerstoff von Arginin 66 der AROS-Hauptkette bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Stickstoff der Hauptkette des Sirt3-Leucins 298. Des Weiteren bindet die Lysin-Seitenkette 65 von AROS in die hydrophobe Tasche des aktiven Zentrums von Sirt3 und ist umgeben von dem katalytischen Histidin 248 sowie den hydrophoben Resten Phe 180, Ile 230, Ile 291 und Phe 294 (Abbildung 35C). Von diesen Sirt3-Resten sind alle bis auf Phe 180 in Sirt1-Sirt7 funktionell konserviert⁵⁵. An der Spitze des Lysins befindet sich eine globuläre Elektronendichte, welche durch die Besetzung eines Wassermoleküls und anschließender Verfeinerung passend erscheint. Die Überlagerung der Sirt3/AROS-Struktur mit einer Sirt3/Substratpeptid-Struktur zeigt, dass das AROS-Peptid den gleichen Bindungsmodus wie das deacylierte Substratpeptid ACS2 einnimmt. Auch die Sirt3/ACS2-Struktur zeigt ein Wassermolekül an der Spitze des Lysins im aktiven Zentrum. Die Ergebnisse der strukturellen Charakterisierung des Sirt3/AROS-Komplexes bestätigen die Erkenntnisse, dass die AROS-Inhibition durch die Konkurrenz mit dem Peptidsubstrat erfolgt.

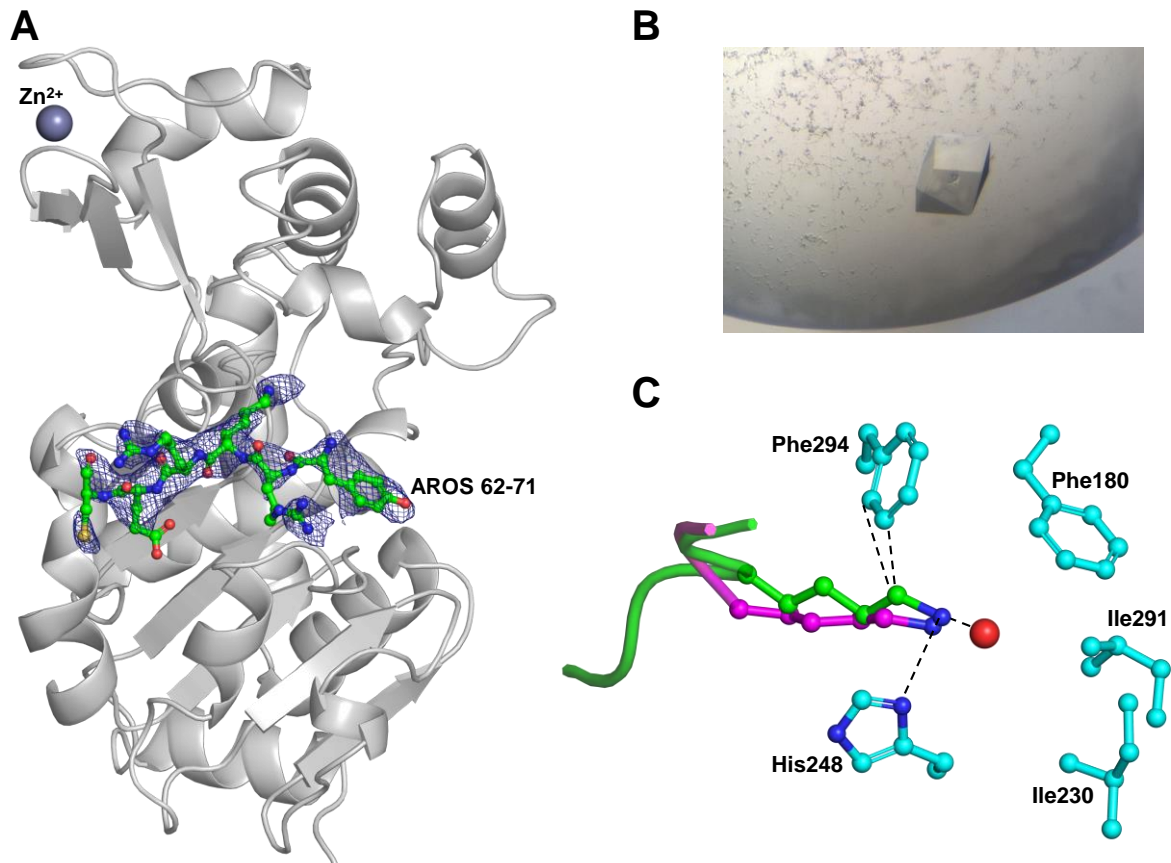


Abbildung 35 AROS besetzt Bindungsstelle des Substratpeptides in Sirt3. (A) Gesamtstruktur von Sirt3 in Cartoon-Darstellung (Grau) mit gebundenen AROS-Peptid 62-71 (Grün) gezeigt als Stäbchen und der überlagerte 2F_o-F_c-Elektronendichte konturiert bei 1,0 σ (Blau) in der Bindungsstelle des Substratpeptides. (B) Sirt3 kokristallisiert mit AROS 62-71 in 12 % PEG 8.000, 0,1 M HEPES pH 7,5 und 0,2 M NaCl. (C) Vergrößerte Ansicht des aktiven Zentrums mit dem katalytischen Histidin 248 von Sirt3 (Cyan) und dem gebundenen Lysin 65 von AROS (Grün) gezeigt als Stäbchen. Der Sirt3/AROS-Struktur wurde eine Sirt3/ACS2-Struktur (pdb-Eintrag: 3GLU⁵⁵) mit dem gebundenen ACS2 (Stäbchen, Magenta) überlagert. Bindungsabstände von 3,2 Å sind als schwarz gestrichelte Linien und Wassermoleküle als rote Kugeln abgebildet.

Die Überlagerung der Sirt3/AROS-Struktur mit einer Sirt1/Substratpeptid-Struktur zeigt, dass der Bindungsmodus des AROS-Peptides auch auf Sirt1 übertragbar ist (Abbildung 36). So sind die mit dem AROS-Lysin 65 interagierenden Sirt3-Reste in Sirt1 konserviert und zeigen in der Überlagerung die gleiche Interaktion mit dem acetylierten p53 Peptidsubstrat. Dem zur Folge lassen sich die Erkenntnisse der Sirt3/AROS-Struktur auch auf Sirt1 übertragen. In Aktivitätstest zeigt das AROS-Peptid 62-71 sowohl für Sirt1 als auch Sirt3 eine inhibitorische Wirkung (Abbildung 37). Die strukturanalytischen und mechanistischen Daten bestärken die Vermutung, dass die grundlegende Interaktion mit AROS über den generischen, katalytischen Sirtuin-

Kern erfolgt und die AROS-Inhibition auf eine Konkurrenz mit dem Peptidsubstrat zurückzuführen ist.

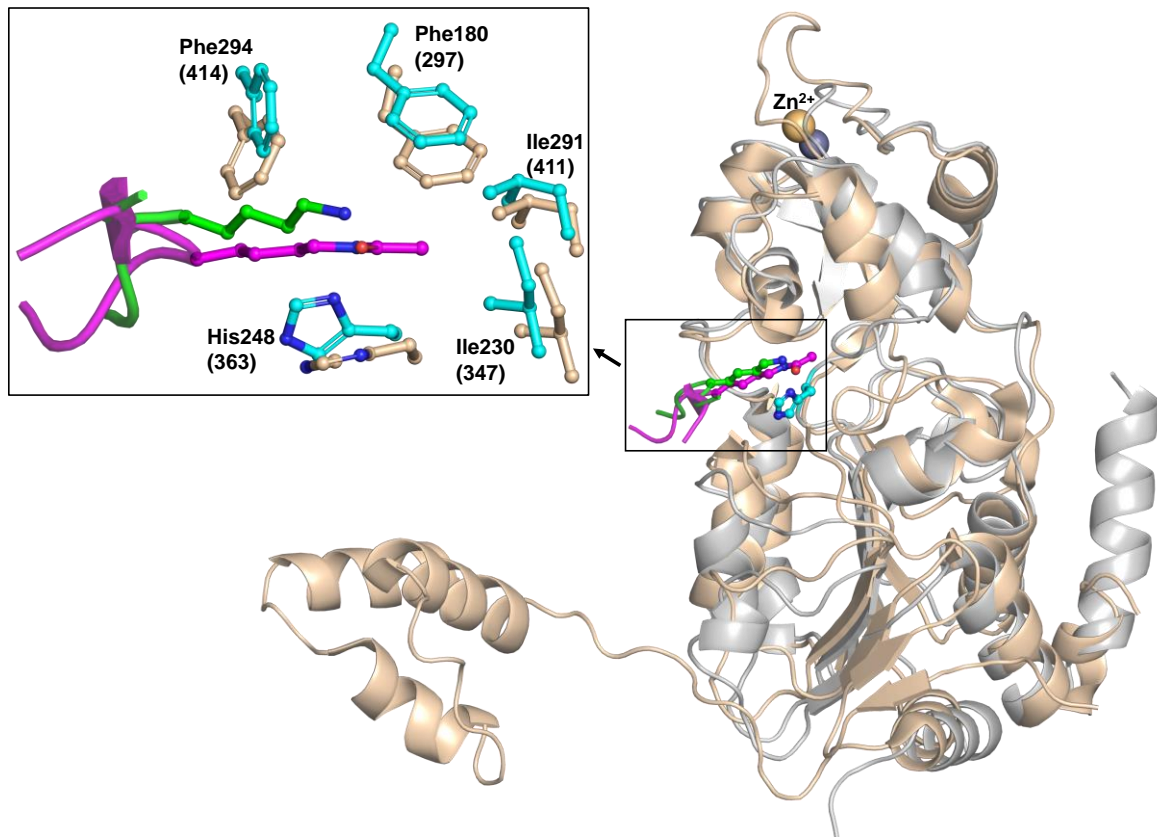


Abbildung 36 AROS besetzt Bindungsstelle des Substratpeptides in Sirt1. Überlagerung der Sirt3/AROS-Struktur (Grau) mit einer Sirt1/Substratpeptid-Struktur (weizenfarbig, pdb-Eintrag: 4ZZJ⁶⁸) in Cartoon-Darstellung. Die vergrößerte Ansicht der Bindungsstelle des AROS-Peptides 62-71 (Grün) mit den interagierenden Resten von Sirt3 (Cyan, Beschriftung ohne Klammern) wurden ebenso wie das acetylierte p53 (Magenta) und interagierenden Reste von Sirt1 (weizenfarbig, Beschriftung in Klammern) als Stäbchen gezeigt.

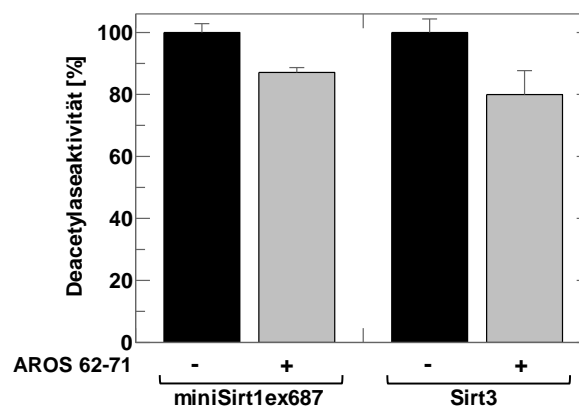


Abbildung 37 AROS-Peptid inhibiert Sirt1 und Sirt3. Aktivitätstest mit 100 μ M FDL-1, je 1 μ M miniSirt1ex687 oder Sirt3 sowie 0,5 mM NAD⁺ in An- (Grau) und Abwesenheit (Schwarz) von 1 mM AROS 62-71 in 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,0 bei 37 °C.

4 Diskussion

4.1 Der Sirt2 Inhibitor Quercetin

Die Sirt2-selektive Inhibition zeigt hinsichtlich der Behandlung von Krankheiten wie z.B. Krebs oder neurodegenerativen Krankheiten therapeutisches Potential^{92–94}. Es wurden bereits zahlreiche Sirt2-Inhibitoren beschrieben und die Bindung an Sirt2 strukturell charakterisiert (Abbildung 38A). Die Bindung der Inhibitoren erfolgt im Acyl-Tunnel von Sirt2 und führt zu konformationellen Änderungen. In Folge dessen bildet sich eine Sirt2-spezifische Bindungstasche, deren Belegung durch die Inhibitoren zu einer potenten und selektiven Hemmung der Isoform beiträgt^{109,141,170,171}.

Die strukturellen Grundlagen der Bindung des Sirt2-Inhibitors Quercetin waren bisher unbekannt. Durch die Lösung des Sirt2/Quercetin-Komplexes konnte der auf Konkurrenz mit dem acylierten Peptidsubstrat basierende Inhibitionsmechanismus aufgeklärt werden. Des Weiteren zeigt sich in den überlagerten Sirt2/Inhibitor-Komplexen, dass das Quercetin eine bisher unbekannte, neue Bindungsstelle in Sirt2 einnimmt (Abbildung 38A). Da bisherige Inhibitoren Schwierigkeiten hinsichtlich ihrer Löslichkeit, Bioverfügbarkeit und Optimierbarkeit zeigen¹⁴², ist der Bedarf an neuen Inhibitorgerüsten gegeben. Quercetin besitzt zwar eine geringe Sirt2-Inhibitionswirkung aber potentere Quercetin-basierende Derivate könnten wie bei anderen Isoformen existieren¹⁷². Die Erkenntnisse der Quercetin-Bindung in Sirt2 könnten somit zur Entwicklung neuer Quercetin-basierender Inhibitoren beitragen. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Quercetin vermittelte Inhibition von Sirt2 nicht isoformspezifisch ist. Die Aktivität der Isoformen Sirt1,3 und Sirt5 wird ebenfalls durch Quercetin inhibiert¹⁵⁷. Eine Überlagerung dieser Isoformen mit dem Sirt2/Quercetin-Komplex zeigt, dass die Quercetin-Bindungsstelle auch in den anderen Isoformen vorhanden ist (Abbildung 38B). Da es sich bei der Quercetin-Bindungsstelle um eine nicht isoformspezifische, flache und exponierte Bindungstasche handelt, könnte die Optimierung eines Inhibitors durch eine starke und spezifische Bindung schwer zu erreichen sein.

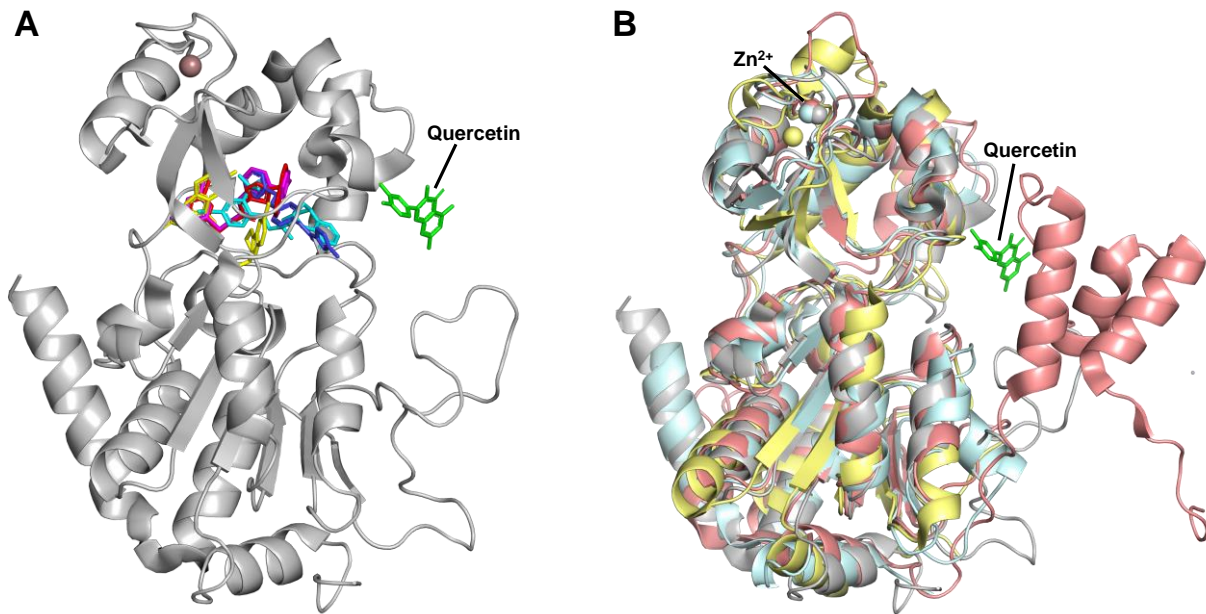


Abbildung 38 Überlagerung verschiedener Sirt2/Inhibitor-Komplexe zeigt das Quercetin in einer bisher unbekannten Bindungsstelle. (A) Überlagerungen von Sirt2/Inhibitor-Komplexen mit Sirt2 als Cartoon (Grau) dargestellt und den gebundenen Inhibitoren Quercetin (Grün, pdb-Eintrag: 6QCN¹⁰⁴), EX-243 (Gelb, pdb-Eintrag: 5D7P¹⁴¹), SirReal2 (Rot, pdb-Eintrag: 4RMG¹⁰⁹), L5C (Blau, pdb-Eintrag: 5YQU¹⁷⁰), NPD11033 (Cyan, pdb-Eintrag: 5Y0Z¹⁷¹) und der auf Thienopyrimidinon basierende Inhibitor (Magenta, pdb-Eintrag: 5MAT¹¹⁰) gezeigt als Stäbchen. (B) Überlagerungen des Sirt2/Quercetin-Komplexes (Grau, pdb-Eintrag: 6QCN¹⁰⁴) mit Sirt1 (lachsfarbig, pdb-Eintrag: 5BTR¹⁷³), Sirt3 (Cyan, pdb-Eintrag: 4HD8⁹⁸) und Sirt5 (Gelb, pdb-Eintrag: 4HDA⁹⁸) und Quercetin (Grün) gezeigt als Stäbchen.

Die Sirt2/Quercetin-Struktur trägt zudem dazu bei, den Sirt6-spezifischen Aktivierungseffekt von Quercetin zu erklären und liefert somit Informationen zur Weiterentwicklung von Sirt6-spezifischen, potenten Modulatoren. So zeigen die Überlagerung der Quercetin-Komplexstrukturen von Sirt2 und Sirt6, dass die Sirt2-Bindungsstelle von Quercetin in Sirt6 durch dessen N-Terminus besetzt ist und folglich für Quercetin nicht zugänglich ist (Abbildung 39A). Das Quercetin-Derivat Isoquercetin stimuliert ebenso die Sirt6-Deacylaseaktivität, wenn auch mit geringerer Wirksamkeit als Quercetin. Auf die anderen Isoformen hat Isoquercetin jedoch keinen signifikanten Effekt. Die Überlagerung von Isoquercetin mit Quercetin in der Sirt2/Quercetin-Struktur zeigt, dass der Zuckeranteil des Isoquercetins mit dem Tyrosin 114 von Sirt2 kollidiert (Abbildung 39B). Der Zuckeranteil scheint somit die Bindung des Liganden am Eingang des aktiven Zentrum sowie die daraus resultierende Inhibition zu verhindern ohne, dass der Sirt6-spezifische Aktivierungseffekt verloren geht. Dadurch lässt sich die verbesserte Selektivität für Sirt6 erklären. Durch Optimierung der Position des Zuckeranteils könnte ein potenterer Ligand entwickelt werden.

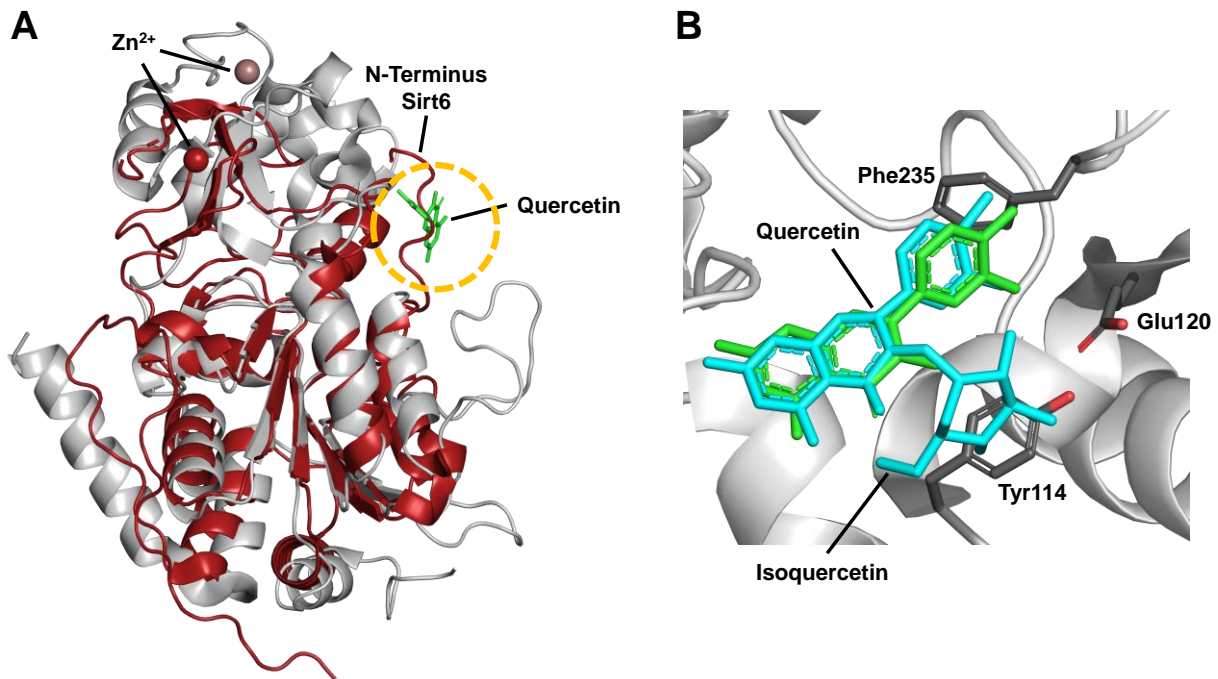


Abbildung 39 Sirt2/Quercetin-Struktur liefert Informationen zur Weiterentwicklung von Sirt6-spezifischen Aktivatoren. (A) Überlagerungen der Sirt2/Quercetin-Struktur (Grau, pdb-Eintrag: 6QCN¹⁰⁴) mit Sirt6 (Rot, pdb-Eintrag: 6QCE¹⁰⁴) als Cartoon dargestellt und den gebundenen Inhibitor Quercetin (Grün) als Stäbchen. (B) Überlagerung von Isoquercetin (Cyan) mit Quercetin (Grün) der Sirt2/Quercetin-Struktur. Gestrichelter, gelber Kreis zeigt, dass der N-Terminus von Sirt6 die Bindung des Quercetin am Eingang des Peptidsubstrattunnels verhindert.

4.2 Neue Bindungsstellen für Kleinmoleküle in Sirt3

Neben der Inhibition von Sirtuinen besitzt auch die Aktivierung therapeutisches Potential. Eine potente, isoformspezifische Aktivierung konnte bereits für Sirt1 und Sirt6 gezeigt werden^{68,157}. Die Stimulation erfolgte dabei über die Sirt1-spezifische N-terminale Domäne (Stac-Domäne) bzw. über die Sirt6-spezifische Tasche des Peptidsubstrattunnels. Auch für Sirt3 konnte bereits eine Aktivierung gezeigt werden, allerdings isoformunspezifisch und nur mit geringem Ausmaß^{102,174}. Aufgrund des Mangels an potenten Sirt3-Aktivatoren wurde ein Screening mit einer Fragmenten-Bibliothek durchgeführt. Mit dieser Methode sollten neue Bindungsstellen in Sirt3 für potenzielle Modulatoren gefunden werden. Die verwendete Bibliothek deckte einen großen chemischen Raum ab und umfasste Pufferbestandteile, Kohlenhydrate, Nukleotide, Aminosäuren, peptidähnliche Fragmente und verschiedene medikamentenähnliche organische Verbindungen¹⁴³. Das durchgeführte Screening mit der verwendeten Fragment-Bibliothek resultierte in zwei Sirt3/Fragment-Strukturen. Diese Fragmente zeigten insgesamt drei Bindungsstellen in Sirt3.

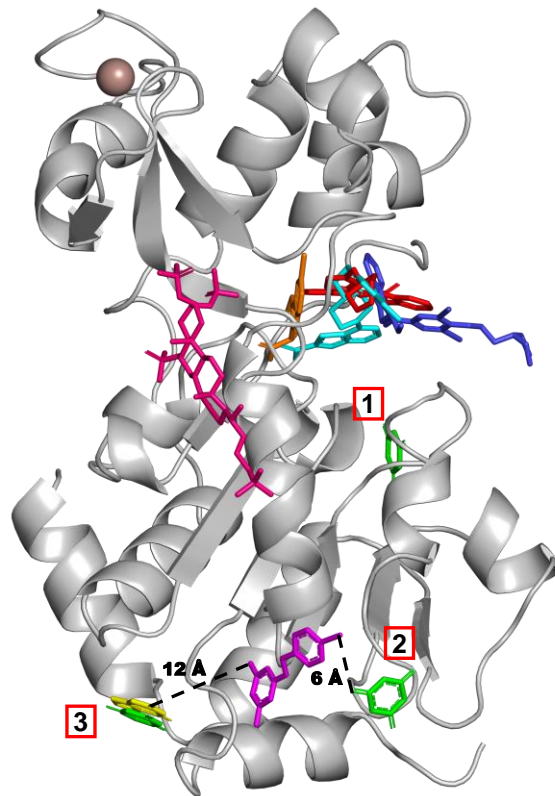


Abbildung 40 Überlagerung verschiedener Sirt3/Ligand- und Sirt3/Fragment-Komplexe zeigt bisher unbekannte Bindungsstellen für Kleinmoleküle. (A) Überlagerungen von Sirt3/Fragment-Komplexen mit Sirt3 als Cartoon (Grau) dargestellt und den gebundenen Fragmenten Azaxanthin (Gelb) und Barbitursäure (Grün) und den Sirt3 Liganden Halistanolsulfat (Pink, pdb-Eintrag: 5Y4H¹⁷⁵), 4'-Bromoresveratrol (Magenta, pdb-Eintrag: 4C78¹⁷⁶), ELT-Inhibitor 1NQ (Cyan, pdb-Eintrag: 4JSR¹⁷⁷), Verbindung BBI (Blau, pdb-Eintrag: 4OZ8), Ex-527 (Orange, pdb-Eintrag: 4BVB¹¹⁹) und SRT1720 (Rot, pdb-Eintrag: 4BN5¹¹¹). Die gestrichelten Linien zeigen den Abstand zwischen den Verbindungen. Die drei Bindungsstellen der Fragmente sind nummeriert und Rot umrandet.

Eine Überlagerung gelöster Sirt3/Ligand-Strukturen (Abbildung 40) zeigt, dass die Bindungsstellen der Fragmente nicht mit anderen bekannten Bindungsstellen übereinstimmen. Die Fragmente in Position 2 und 3 befinden sich mit einem Abstand von 6 bzw. 12 Å in der Nähe des 4'-Bromoresveratrols, welches eine inhibitorische Wirkung auf die Sirt3-Deacetylaseaktivität besitzt¹⁷⁶. Interessanter ist jedoch die Position 1, die sich in der ADPr-Bindungsstelle im aktiven Zentrum von Sirt3 befindet und lediglich von der Barbitursäure besetzt wird. Obwohl keine Wirkung der Fragmente auf die Sirt3-Deacetylaseaktivität gezeigt werden konnte, könnten sie dennoch Potenzial zur Modulation der Sirtuinaktivität besitzen. Die Methode des kristallografischen Screenings mit einer Fragment-Bibliothek ist so konzipiert, dass auch schwach bindende Fragmente mit Bindungskonstanten im millimolarem Bereich

identifiziert werden können. Durch Testung neuer Verbindungen, die auf dem Gerüst der Barbitursäure bzw. von Azaxanthin beruhen, könnten Nachfolgemoleküle, die mit höherer Potenz binden, gefunden werden. Dies könnte auch in einer Modulation der Sirt3-Deacetylaseaktivität resultieren. Basierend auf dem Gerüst des Sirtuin-Inhibitors NAM, das ebenso wie die Barbitursäure im aktiven Zentrum bindet, konnte bereits gezeigt werden, dass sich wirksame sowie selektive Modulatoren wie z.B. die Aktivatoren DHPs entwickeln lassen¹⁰². Des Weiteren bietet eine Verbindung, bestehend aus einem 4-Bromoresveratrol- und einem Barbitursäureanteil, die Möglichkeit ein Nachfolgemolekül mit hoher Affinität und Modulationspotenzial zu entwickeln. Durch Verwendung anderer Kristallisationsbedingungen wie z. B. der Kokristallisation mit dem Nukleotidsubstrat könnten weitere Fragmente und Bindungsstellen gefunden werden, die zur Entwicklung von Aktivatoren beitragen könnten. Ebenso wäre die Anwendung dieser Methode für andere Isoformen eine Möglichkeit potenzielle Modulatoren zu entwickeln.

4.3 AROS ist ein flexibles Protein mit Potential zur Strukturinduzierung

Aufgrund des therapeutischen Potentials der Sirt1-Regulation ist die Aufklärung der Interaktion mit AROS von großem medizinischem Interesse. Über das AROS-Protein, welches als Aktivator von Sirt1 beschrieben wurde¹²², ist jedoch nur wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte AROS zum ersten Mal charakterisiert werden. Dazu wurde ein Renaturierungsprotokoll, welches das Protein in großer Ausbeute und mit hoher Reinheit zur Verfügung stellt, etabliert.

Die bioinformatische Analyse ließ vermuten, dass AROS ein teilstrukturiertes Protein mit α -helikalen Elementen ist. CD-spektroskopischen Messungen sowie das Laufverhalten des renaturierten Proteins bestätigten den flexiblen Charakter. Obwohl AROS kein globuläres Protein ist, nimmt es dennoch eine kompakte Struktur, welche durch chemische Stoffe entfaltet werden kann, ein. Die fehlende, stabile Tertiärstruktur des Proteins sowie das Vorhandensein von Sekundärstrukturelementen wie α -Helices lässt sich auch mit NMR bestätigen.

Proteine, die keine stabile Tertiärstruktur besitzen, zeigen unterschiedliche Verhaltensweisen. Es gibt zahlreiche Proteine, welche sich in Folge einer Interaktion mit einem Bindungspartner strukturieren (*Disorder to order transition*). Hierbei handelt es sich um metabolische Liganden, andere Proteine, *crowding* Bedingungen oder

Ionen^{166,178–180}. Des Weiteren können auch PTMs zu einer Strukturierung des Proteins führen^{181,182}. Andere Proteine hingegen besitzen auch im Komplex mit dem Interaktionspartner keine stabile Tertiärstruktur (Fuzzy complexes)^{183,184}.

AROS ist in der Lage eine strukturiere Konformation einzunehmen. Die Zugabe von TFE stabilisiert vorhandene α -Helices, induziert die Bildung weiterer und resultiert in der Ausbildung einer stabilen Tertiärstruktur von AROS. Der Mechanismus der Strukturinduzierung durch TFE ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Denkbar ist eine direkte Wechselwirkung zwischen TFE und dem Protein oder ein indirekter Mechanismus, der auf einer Nachahmung des hydrophoben Effektes beruht¹⁸⁵. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob durch die TFE-Titration lediglich die inhärente Neigung der Aminosäuresequenz von AROS zur Ausbildung von Sekundärstrukturen abgebildet wird oder AROS eine physiologisch relevante Konformation einnimmt. Daher sollte die Strukturinduzierung von AROS durch die physiologisch relevante Verbindung Glycerol validiert werden. Ebenso wie TFE stabilisiert und induziert auch Glycerol α -Helices in AROS. Im physiologischen Kontext lässt sich die Wirkung von Glycerol durch einen *Crowding* Effekt, der die Bedingungen innerhalb einer Zelle nachahmt, erklären. Des Weiteren wäre es denkbar, dass Glycerol einen metabolischen Liganden imitiert und durch eine direkte Wechselwirkung mit AROS eine Strukturierung des Proteins zur Folge hat. Die Strukturinduzierung durch TFE und Glycerol lässt vermuten, dass das Protein dazu neigt, eine strukturiere Konformation unter stabilisierenden Bedingungen wie z.B. im Komplex mit einem Interaktionspartner oder in Folge einer PTM einzunehmen (Abbildung 41). Ob es sich bei einem Interaktionspartner um einen metabolischen Liganden oder ein anderes Protein handeln könnte, ist unklar. Potenzielle Interaktionspartner wären das Protein S19 der Ribosomenuntereinheit 40S (*40S ribosomal protein S19*) und Sirt1^{186,187}. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass eine PTM zur Strukturiertheit des Proteins führt. Für AROS sind bisher nur zwei PTMs beschrieben. Zum einen lässt sich eine Citrullin-Modifikation aufgrund einer Sequenzähnlichkeit vermuten und zum anderen wurde durch Analysen des humanen Phosphoproteoms eine Phosphorylierung am Serin 84 identifiziert¹⁸⁸.

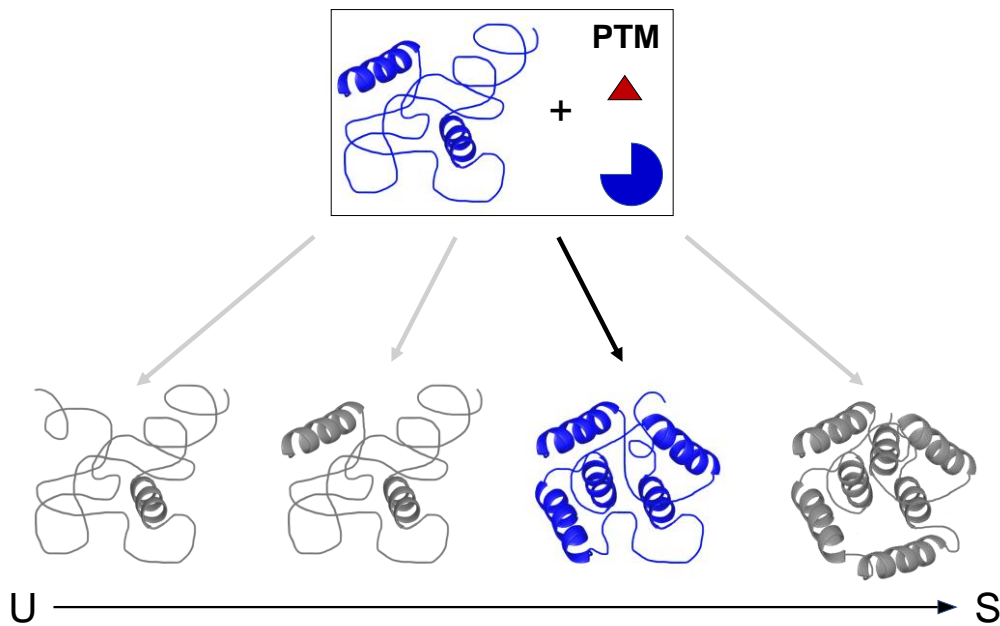


Abbildung 41 Das flexible AROS zeigt eine Neigung eine strukturierte Konformation mit α -helikalen Sekundärstrukturelementen anzunehmen. Schematische Darstellung wie stabilisierende Bedingungen wie z.B. eine posttranslationale Modifikation (PTM), ein metabolischer Ligand (▲) oder ein anderes Protein (●) zu einer strukturierten Konformation des AROS-Proteins führen könnten. U: unstrukturiert; S: strukturiert.

AROS besitzt aufgrund des flexiblen Charakters keine konformationelle Homogenität und muss daher für die strukturelle Charakterisierung mittels Kristallisation stabilisiert werden. Trotz zahlreicher Kristallisationsversuche mit diversen Screens konnte keine stabilisierende Bedingung, die in einer Kristallisation des Proteins resultiert hätte, gefunden werden. Kristallisationsansätze mit dem strukturinduzierenden TFE führten in Kombination mit einer relativ hohen AROS-Konzentration zu einer Reduzierung der Löslichkeit des Proteins und in Folge dessen zur Präzipitation. Glycerol wurde in einer physiologisch relevanten Konzentration (25 %) als *Crowding* Reagenz eingesetzt¹⁸⁹, führte jedoch ebenfalls nicht zur Kristallisation des Proteins. Für weitere Kristallisationsansätze könnte nach einer anderen strukturinduzierenden Verbindung gesucht werden. Die Identifizierung einer PTM, die zu einer Strukturierung des Proteins führen könnte, würde ebenfalls ein Ausgangspunkt zur strukturellen Charakterisierung mittels Kristallisation darstellen. AROS konnte erfolgreich ^{15}N - ^{13}C -markiert werden. Damit wurden Voraussetzungen zur Strukturaufklärung mittels NMR geschaffen. Allerdings konnten aufgrund von Stabilitätsproblemen der Proteinlösung die entsprechenden Experimente unter den erforderlichen Bedingungen nicht durchgeführt werden.

4.4 AROS inhibiert Sirt1 durch Konkurrenz mit dem Acyl-Peptidsubstrat

Der Einfluss von AROS auf die Aktivität von Sirt1 ist nicht eindeutig geklärt. Entgegen der ersten Publikation, in der AROS als Aktivator von Sirt1 beschrieben wurde¹²², konnten andere Autoren die AROS vermittelte Sirt1-Aktivierung nicht reproduzieren¹²⁵⁻¹²⁷. Bereits Kokkola *et al.* zeigten, dass AROS zwar mit Sirt1 direkt interagiert aber die Stabilität des Komplexes sowie der Einfluss auf die Deacetylaseaktivität von der Pufferbedingung abhängig ist¹²⁷. In der vorliegenden Arbeit wurde die Stabilität des AROS/Sirt1-Komplexes zum ersten Mal systematisch in verschiedenen Puffersystemen analysiert. Dabei bestätigte sich die Beobachtung von Kokkola *et al.* Unter den getesteten zahlreichen Bedingungen, führte lediglich ein Phosphatpuffer bei einem neutralen pH-Wert zur Stabilisierung des Komplexes. Die Verwendung einer nicht optimalen Pufferbedingung könnte ein Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Ergebnisse der bisherigen Studien sowie die Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit sein. Die Stabilisierung des Proteinkomplexes durch Optimierung der Pufferbedingung schuf die Voraussetzung, um valide *in vitro* Daten zur Interaktion der beiden Proteine generieren zu können.

Mit Hilfe des FDL-Aktivitätstest sowie dem enzymgekoppelten Aktivitätstest konnte eine AROS-vermittelte Inhibition der Deacetylaseaktivität von Sirt1 ($IC_{50}=11 \pm 1 \mu M$) nachgewiesen werden. Auffällig dabei war die im Vergleich zum FDL-Aktivitätstest schwächere Inhibition durch AROS im enzymgekoppelten Aktivitätstest. Ursächlich dafür könnte die unterschiedliche Affinität der Peptidsubstrate (FDL1 bzw. p53-Peptid) zum Enzym sein. Das physiologische p53-Peptid bindet mit einer höheren Affinität als das fluoreszenzmarkierte FDL1¹⁹⁰. Dies ist ein Hinweis für einen zum Peptidsubstrat kompetitiven Inhibitionsmechanismus, welcher sich in den anschließenden Konkurrenzexperimenten mit den Sirt1 Substraten bestätigen lies. Die geringere Affinität des Peptidsubstrates in Anwesenheit von AROS spricht für einen Konkurrenzmechanismus. Da auch die Maximalgeschwindigkeit in Anwesenheit von AROS geringfügig sinkt, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um einen gemischten Inhibitionsmechanismus handelt. Die Affinität des Nukleotidsubstrates bleibt auch in Anwesenheit von AROS nahezu unverändert. AROS scheint somit hauptsächlich mit dem Acyl-Peptidsubstrat zu konkurrieren.

4.5 AROS verhindert Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes

Die direkte Interaktion von AROS und Sirt1 wurde *in vivo* mit Immunpräzipitation und *in vitro* mit einem GST-Pulldown nachgewiesen¹²². Eine strukturelle Charakterisierung des Proteinkomplexes fand bisher nicht statt. Da Kristallisationsversuche des Sirt1/AROS-Komplexes erfolglos blieben, wurde die Interaktion der beiden Proteine mittels NMR untersucht.

Durch ¹⁵N-Markierung von AROS und anschließender Titration von Sirt1 konnte in HSQC-Experimenten eine direkte Interaktion der beiden Proteine gezeigt werden. Entsprechend der NMR-Daten zeigten ca. ein Drittel von AROS Signalveränderung und somit eine Interaktionsbeteiligung. Die an der Interaktion beteiligten Aminosäuren befanden sich in einem mittleren chemischen Austausch, der in Kombination mit der großen Molekülmasse des Proteinkomplexes in einem nicht detektierbaren Signal im gebundenen Zustand resultierte. Die Bestimmung der Bindungskonstante mittels NMR war daher nicht möglich, aber der beobachtete mittlere chemische Austausch lässt eine Affinität im mikromolaren Bereich vermuten¹⁶⁹. Die Bestimmung der Bindungskonstante mittels MST ergab eine einstellige mikromolare Affinität ($1,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$). Die Erkenntnisse der NMR-Experimente bestätigten sich damit. Bisher wurden keine Bindungsaffinitäten des AROS/Sirt1-Komplexes publiziert und somit gibt es auch keinen Vergleichswert aus der Literatur. Protein-Protein-Interaktion mit einer mikromolaren Affinität lassen eine transiente Wechselwirkung vermuten¹⁹¹. Eine transiente scheint im Gegensatz zu einer permanenten Wechselwirkung für die endogene Regulation von Sirt1 als zentrale Deacetylase mit einer Vielzahl an Funktionen durch das AROS-Protein plausibel. Zudem ist eine Bindungskonstante, die um eine Größenordnung niedriger ist als die Inhibitionskonstante, mit dem postulierten Kompetitionsmechanismus konsistent.

Inwiefern die Bindung mit dem Interaktionspartner Sirt1 die Struktur des flexiblen AROS-Proteins beeinflusst, konnte mittels NMR nicht genauer untersucht werden. Die chemischen Verschiebungen der an der Bindung beteiligten Reste waren in dem gebundenen Zustand nicht detektierbar. Die Frage bleibt offen, ob es zu einer Strukturierung des AROS-Proteins nach Bindung mit Sirt1 kommt. Die Verwendung kürzere AROS-Varianten sowie Mutations- oder Deletionsvarianten, die die Affinität von AROS zu Sirt1 beeinflussen, könnten zu einer Detektierbarkeit der Signale im

gebundenen Zustand führen und damit zur genaueren Charakterisierung des Proteins im Komplex.

Die Strukturlösung des Proteinkomplexes war weder mit Kristallographie noch NMR möglich. Daher erfolgte die strukturelle Charakterisierung des Proteinkomplexes durch schrittweise Analyse der Interaktionsfläche. Die Zuordnungsexperimente mit AROS sowie die Aktivitätstest mit verkürzten AROS-Konstrukten ergaben eine Beteiligung des N- als auch C-Terminus sowie der mittlere Bereich von AROS an der Sirt1-Interaktion. Dabei scheint der mittlere Teil des Proteins (Aminosäuren 39-89) für die Inhibition verantwortlich zu sein. N- und C-Terminus erhöhen die inhibitorische Wirkung von AROS auf die Sirt1-Deacetylaseaktivität, vermutlich in Folge der Erhöhung der Bindungsaffinität durch zusätzliche Bindungsstellen. So zeigte die C-terminal deletierte AROS-Variante (1-89) eine 50-fach geringere Affinität zum Sirt1. Zudem konnte mit Quervernetzungsexperimenten eine potenzielle Bindungsstelle am Lysin 102 von AROS identifiziert werden. Bindungsstudien mit verschiedenen AROS-Peptiden ergaben für das Peptid 62-71 die höchste Bindungsaffinität. In Aktivitätstest konnte dieses Peptid die Aktivität von Sirt1 hemmen, jedoch verglichen mit dem Volllänge-AROS in einem geringeren Ausmaß.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse daraufhin, dass das AROS-Peptid 62-71 für die AROS vermittelte Inhibition der Sirt1-Deacetylaseaktivität verantwortlich ist. Andere N- sowie C-terminale Bereiche des Proteins erhöhen die inhibitorische Wirkung signifikant. Zum einen könnte eine Erhöhung der Bindungsaffinität durch zusätzlichen Bindungsstellen, wie MST-Messungen mit Deletionsmutanten sowie Quervernetzungsexperimente vermuten lassen, die Ursache sein. Zum anderen könnten die C- und N-terminalen Bereiche Strukturen im AROS-Protein stabilisieren, die für die Inhibition wichtig sind.

Kim *et al.* postulierten, dass die Aminosäuren 114-217 von Sirt1 ausreichend für die Interaktion mit AROS sind. Es konnte gezeigt werden, dass AROS mit der SBD (183-230) interagiert, jedoch mit geringerer Bindungsaffinität verglichen mit dem miniSirt1. Die SBD zeigt zusammen mit der katalytischen Domäne, welche sich C-terminal von der SBD befindet, eine deutlich höhere Affinität zum AROS-Protein. Des Weiteren konnte mit NMR die Bindung einer Sirt1-Deletionsvariante ohne die Aminosäuren 1-230 gezeigt werden. Somit ist die Interaktion nicht allein auf den

N-terminalen Bereich mit der SBD zurückzuführen. Vielmehr zeigen Aktivitätstest mit anderen Sirtuinisoformen, denen die Sirt1 spezifische SBD fehlt, ebenfalls eine Inhibition der Deacylaseaktivitäten durch AROS. Die AROS vermittelte Inhibition der Deacylaseaktivität scheint dementsprechend hauptsächlich über Interaktion mit dem generischen, katalytischen Sirtuinkern zu erfolgen. Da die inhibitorische Wirkung des AROS-Proteins auf die anderen Isoformen im Vergleich zu Sirt1 geringer ausfällt, scheinen zusätzliche Bindungsstellen wie in der SBD die Affinität und damit die Inhibitionsstärke zu erhöhen. Co-Immunpräzipitationen mit einer Phosphomimiky-Mutante von Sirt1 (S682D) lassen eine Beteiligung des C-terminalen Bereiches mit dem Sirt1 Serin 682 an der Komplexbildung mit AROS vermuten. Conrad *et al.* zeigten, dass der pseudo-phosphorylierte Zustand von Sirt1 zu einer abgeschwächten Interaktion mit AROS führt¹²⁵. Die Deacetylaseaktivität einer Phosphomimiky-Mutante des Serins 682 von Sirt1 wurde durch AROS im gleichen Maße wie die Aktivität des Wildtyps gehemmt. Ein direkter Einfluss des pseudo-phosphorylierten Zustands von Sirt1 auf die Inhibitionswirkung durch AROS konnte somit nicht nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigen NMR-Daten mit einer Sirt1 Variante ohne die ESA-Region (640-650), dass trotz Deletion des C-Terminus von Sirt1 die Interaktion erhalten bleibt. Dies deutet daraufhin, dass der C-Terminus von Sirt1 nicht essenziell für die Komplexbildung ist.

Kokristallisationen mit dem inhibierenden AROS-Peptid 62-71 und Sirt3 resultierten in einer Komplexstruktur. Die AROS/Sirt3-Kristallstruktur zeigt die Bindung des AROS-Peptids 62-71 in der Bindungsstelle des Acylpeptides im katalytischen Zentrum des Sirtuins. Folglich konnte mit dieser Struktur und den biochemischen Daten gezeigt werden, dass die AROS-vermittelte Inhibition der Deacylaseaktivität durch Competition mit dem Peptidsubstrat hervorgerufen wird. Dieser Mechanismus kann auf die Isoformen Sirt1-3 und Sirt5 übertragen werden. Bei dem Sirt3/AROS-Komplex handelt es sich um ein strukturelles Modell. Die Sirt3-Interaktion mit AROS ist physiologisch nicht relevant, da es sich um ein mitochondriales Sirtuin handelt und AROS im Nukleus sowie im Cytoplasma und nicht im Mitochondrium lokalisiert ist¹²³. Physiologisch wäre neben der Sirt1-Interaktion eine Komplexbildung von AROS mit Sirt2 denkbar.

Zusätzlich zu der Bindungsstelle im aktiven Zentrum zeigen Quervernetzungs-, NMR- und MST-Experimente weitere AROS-Interaktionsflächen im Sirtuin. Die

Quervernetzungsexperimente ergaben weitere Bindungsstellen am Übergang der katalytischen Domäne zur SBD in Sirt1 sowie im Bereich der zinkbindenden Domäne und dem Übergangsbereich zwischen zinkbindender Domäne und katalytischen Domäne in Sirt5. Von diesen Erkenntnissen ausgehend wurde ein Modell des Sirt1/AROS-Komplexes erstellt (Abbildung 42B). Hierbei diente das Ergebnis einer dreidimensionalen Strukturvorhersage, welches mit Hilfe des Programms RaptorX angefertigt wurde, als Modell für AROS (Abbildung 42A)¹³⁸. Die dreidimensionale Strukturvorhersage von AROS zeigt ein flexibles Protein mit einem α -helikalen Anteil und stimmt in dieser Hinsicht mit den Ergebnissen der strukturellen Charakterisierung überein. Zur Erstellung des Komplexmodells mit Sirt1 wurde in dem AROS-Modell der C-Terminus relativ zu dem N-Terminus gedreht. Als Sirt1-Modell diente eine Kristallstruktur von miniSirt1. Unter Verwendung der strukturellen und mechanistischen Daten kann das folgende Modell für den Sirt1/AROS-Komplex generiert werden.

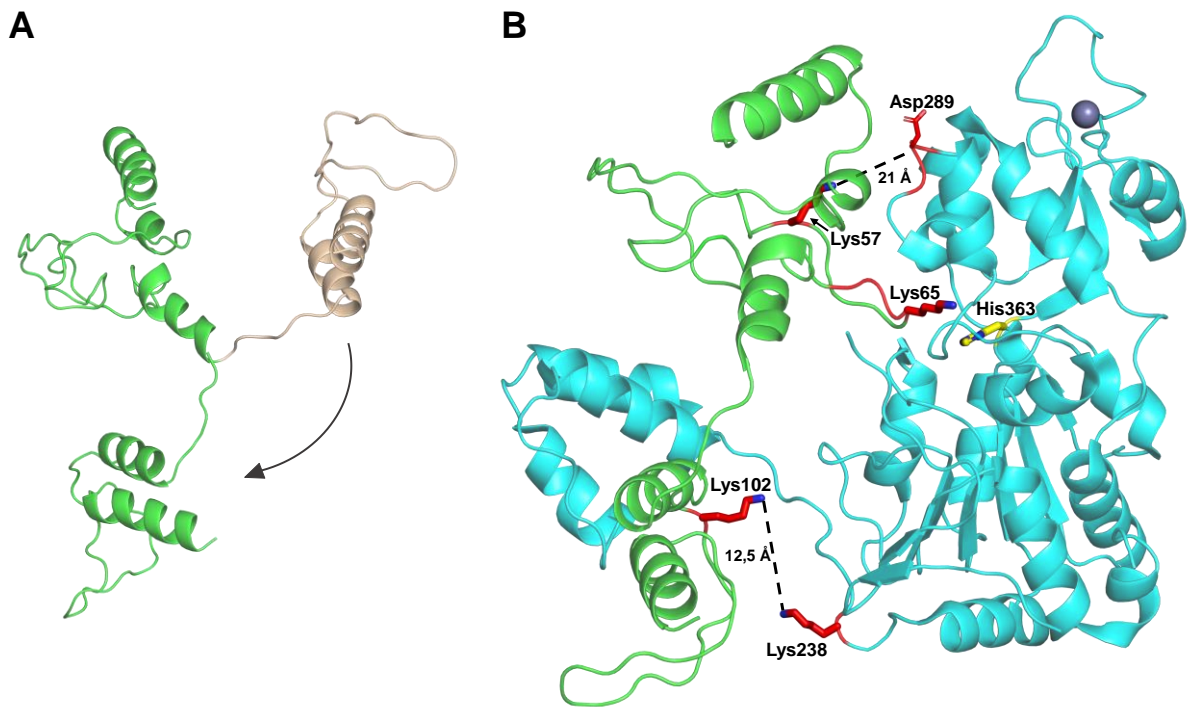


Abbildung 42 Postuliertes Modell des Sirt1/AROS-Komplexes. (A) Dreidimensionale Strukturvorhersage des AROS-Proteins durch das Programm RaptorX dargestellt als Cartoon. Die ursprüngliche Lage des C-Terminus (weizenfarbig) wurde verändert. (B) Darstellung der Sirt1 (Cyan; pdb-Eintrag: 4zzh) Interaktion mit AROS (Grün) unter Einbeziehung der Sirt3/AROS-Struktur sowie Ergebnisse von Quervernetzungsexperimenten. An der Interaktion beteiligte Aminosäurereste (Rot) sowie das katalytische Sirt1-Histidin 363 (Gelb) sind als Stäbchen (Sauerstoff: Blau) dargestellt.

Das Sirt1/AROS-Modell zeigt die Bindung des AROS Lysins 65 im aktiven Zentrum von Sirt1, nahe dem katalytischen Histidin 363. Da die massenspektrometrische Analyse eine Quervernetzung des AROS Lysins 102 mit dem Sirt1 Lysin 238 ergab, wurde der C-Terminus relativ zu dem N-Terminus des AROS-Modells rotiert, so dass die beiden Lysine einen Abstand von 12,5 Å besitzen. Dies entsprach dem Abstand quervernetzter DSSO-Moleküle. Das postulierte Sirt1/AROS-Modell berücksichtigt auch die Ergebnisse der MST- und NMR-Messungen, demzufolge das AROS-Protein mit der SBD interagiert. Des Weiteren veranschaulicht das Sirt1/AROS-Modell, dass das Lysin 57 von AROS mit 21 Å in der Nähe der Asparaginsäure 289 der zinkbindenden Domäne von Sirt1 liegt. Eine Überlagerung von Sirt1 und Sirt5 ergab, dass sich die Asparaginsäure 289 von Sirt1 an der Stelle des Lysins 79 von Sirt5 befindet. Das Lysin von Sirt5 wurde in Kombination mit dem Lysin 57 von AROS in massenspektrometrischen Analysen identifiziert. Ein Teil der identifizierten Quervernetzung durch DSSO-Experimente mit Sirt5 und AROS können mit diesem Modell erklärt werden.

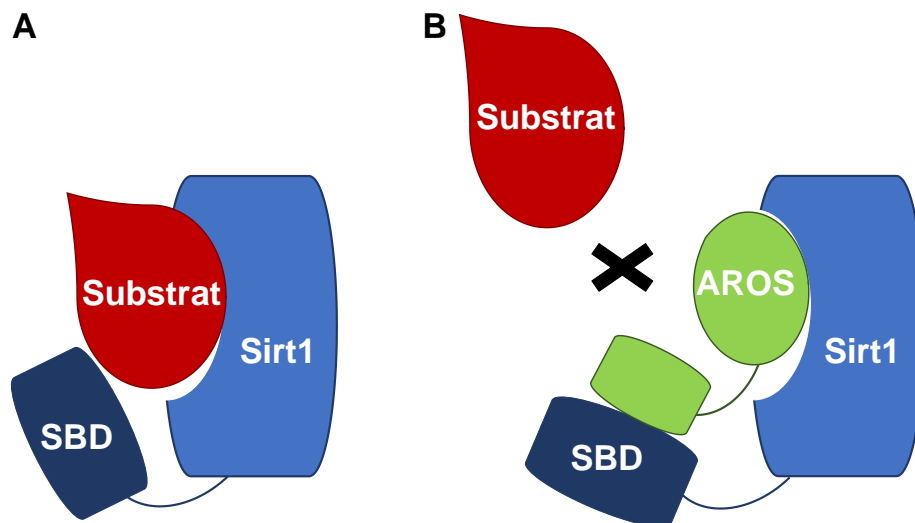


Abbildung 43 AROS verhindert Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes durch Interaktion mit der SBD und der katalytischen Domäne. (A) Das acetylierte Substrat bindet an die katalytische Domäne von Sirt1. Durch direkte Interaktion der SBD mit der katalytischen Domäne wird der Enzym-Substrat-Komplex stabilisiert. (B) Die Bindung des AROS-Proteins an die Bindungsstelle des acetylierten Substrates und an die SBD verhindert die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes.

Der N-Terminus einschließlich der SBD von Sirt1 hat eine regulatorische Wirkung auf die Sirt1-Deacetylaseaktivität. So konnte gezeigt werden, dass eine direkte Interaktion des N-Terminus mit der katalytischen Domäne die Interaktion mit dem Substrat NF-κB

p65 fördert und dadurch die Deacetylaseaktivität erhöht¹⁹². Hinzu kommt, dass durch die allosterische Bindung von Kleinmolekülen an der SBD die Sirt1-Aktivität stimuliert werden kann. Der zugrundeliegende Aktivierungsmechanismus beruht vermutlich auf der Bildung einer Salzbrücke der Aminosäurereste Glutaminsäure 230 der SBD mit dem Arginin 446 der katalytischen Domäne, infolgedessen die Affinität mit dem Substrat erhöht wird^{67,193}. Neben der Kompetition des AROS Lysins 65 mit dem acetylierten Peptidsubstrat im aktiven Zentrum könnte die Bindung von AROS an die SBD zusätzlich die Affinität zum Substrat verringern. Eine inaktive Form des Sirtuins könnte durch AROS stabilisiert werden, wodurch eine Rekrutierung eines Substrates mit anschließender Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes erschwert wird (Abbildung 43).

4.6 Wie wird die Sirt1/AROS-Interaktion reguliert?

Über die Regulation der Sirt1/AROS-Interaktion ist nur wenig bekannt. Ein direkter Einfluss der Phosphorylierungen des Sirt1 Serins 682 auf die inhibitorische Wirkung durch AROS konnte nicht gezeigt werden. Die Möglichkeit besteht, dass die Bindung eines weiteren Proteins durch die Phosphorylierung des Serins 682 reguliert wird und dieses Protein wiederum die Sirt1/AROS-Interaktion beeinflusst. Es gibt eine Vielzahl von verschiedenen PTMs wie Phosphorylierungs-, Methylierungs-, Nitrosylierungs- als auch eine SUMOylierungsstellen, die für Sirt1 identifiziert wurden und potenzielle Regulationsmöglichkeiten für die Sirt1/AROS-Interaktion darstellen⁷¹. Auch PTMs im AROS-Protein könnten die Interaktion regulieren. Die Pseudophosphorylierung des Serins 84 in AROS, welche die bisher einzige bekannte PTM-Stelle ist¹⁸⁸, zeigte keinen Unterschied zum Wildtyp auf die AROS vermittelte Sirt1-Inhibition. Neben PTMs sind auch metabolische Liganden oder andere Interaktionspartner als Regulatoren des Sirt1/AROS-Komplexes denkbar. So zeigt der N-Terminus mit der SBD die Möglichkeit zur Aktivierung infolge einer allosterischen Bindung durch Kleinmoleküle⁶⁸. Eine vergleichbare endogene Regulation durch einen Metaboliten oder anderen Interaktionspartner ist nicht bekannt, könnte aber einen Einfluss auf die Sirt1/AROS-Interaktion haben. Des Weiteren kann AROS mit der kleinen 40S Untereinheit des Ribosoms assoziieren und ist an der ribosomalen Biogenese beteiligt. Die genaue Funktion und molekularen Zusammenhänge sind jedoch noch ungeklärt. Da es sich bei AROS um ein flexibles Protein handelt, bei dem unter bestimmten Bedingungen Struktur induziert werden kann, besteht die Möglichkeit, dass ein weiterer

Interaktionspartner wie z.B. das ribosomale Protein S19, RNA oder ein Metabolit eine Konformation von AROS stabilisiert, die die Bindung an Sirt1 verstärkt oder verhindert und dadurch die Sirt1/AROS-Interaktion reguliert.

5 Literaturverzeichnis

1. Tools, B. Advances in Identifying and Characterizing the Human Proteome. (2019) doi:10.1021/acs.jproteome.9b00745.
2. Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S. & Gatto, G. J. Protein posttranslational modifications: The chemistry of proteome diversifications. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **44**, 7342–7372 (2005).
3. Black, D. L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 291–336 (2003).
4. Maniatis, T. & Tasic, B. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. **418**, (2002).
5. Fischer, E. H. & Krebs, E. G. The isolation and crystallization of rabbit skeletal muscle phosphorylase b. *J Biol Chem* **231**, 65–71 (1958).
6. Fischer, E. H. & Krebs, E. G. Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J. Biol. Chem.* **216**, 121–132 (1955).
7. Johnson, L. N. & Lewis, R. J. Structural basis for control by phosphorylation. *Chem. Rev.* **101**, 2209–2242 (2001).
8. Norvell, A. & McMahon, S. B. Rise of the rival. *Science (80-.).* **327**, 964–965 (2010).
9. Allfrey, G., Faulkner, R. & Mirsky, A. E. Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis *. *Biochemistry* **315**, 786–794 (1964).
10. Wu, J. & Grunstein, M. 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 619–623 (2000).
11. Rauh, D. *et al.* An acetylome peptide microarray reveals specificities and deacetylation substrates for all human sirtuin isoforms. *Nat. Commun.* **4**, (2013).
12. Choudhary, C., Weinert, B. T., Nishida, Y., Verdin, E. & Mann, M. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 536–550 (2014).
13. Choudhary, C. *et al.* Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science (80-.).* **325**, 834–840 (2009).
14. Morris, B. J. Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. *Free Radic. Biol. Med.* **56**, 133–171 (2013).
15. Herskovits, A. Z. & Guarente, L. SIRT1 in Neurodevelopment and Brain Senescence. *Neuron* **81**, 471–483 (2014).
16. Wang, Q. *et al.* Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux. *Science (80-.).* **327**, 1004–1007 (2010).
17. Pougovkina, O. *et al.* Mitochondrial protein acetylation is driven by acetyl-CoA from fatty acid oxidation. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 3513–3522 (2014).

18. Lombardi, P. M., Cole, K. E., Dowling, D. P. & Christianson, D. W. Structure, mechanism, and inhibition of histone deacetylases and related metalloenzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21**, 735–743 (2011).
19. Sauve, A. A., Wolberger, C., Schramm, V. L. & Boeke, J. D. The Biochemistry of Sirtuins. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 435–465 (2006).
20. Brachmann, C. B. *et al.* The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes Dev.* **9**, 2888–2902 (1995).
21. Kaeberlein, M., McVey, M. & Guarente, L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* **13**, 2570–2580 (1999).
22. Frye, R. A. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**, 793–798 (2000).
23. Vassilopoulos, A., Fritz, K. S., Petersen, D. R. & Gius, D. The human sirtuin family: Evolutionary divergences and functions. *Hum. Genomics* **5**, 485–496 (2011).
24. Inoue, T. *et al.* SIRT2, a tubulin deacetylase, acts to block the entry to chromosome condensation in response to mitotic stress. *Oncogene* **26**, 945–957 (2007).
25. Gertz, M. & Steegborn, C. Using mitochondrial sirtuins as drug targets: disease implications and available compounds. *Cell. Mol. life Sci.* **73**, 2871–2896 (2016).
26. Zhang, T. & Kraus, W. L. SIRT1-dependent Regulation of Chromatin and Transcription: Linking NAD⁺ Functions. *Biochim Biophys Acta* **1804**, 1666–1675 (2010).
27. Motta, M. C. *et al.* Mammalian SIRT1 Represses Forkhead Transcription Factors. *Cell* **116**, 551–563 (2004).
28. Martinez-Pastor, B. & Mostoslavsky, R. Sirtuins, metabolism, and cancer. *Front. Pharmacol.* **3 FEB**, 1–7 (2012).
29. Jin, Q. *et al.* Cytoplasm-localized SIRT1 enhances apoptosis. *J. Cell. Physiol.* **213**, 88–97 (2007).
30. Kugel, S. & Mostoslavsky, R. Chromatin and beyond: the multitasking roles for SIRT6. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 72–81 (2014).
31. Jiang, H. *et al.* SIRT6 regulates TNF- α secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine. *Nature* **496**, 110–113 (2013).
32. Du, J. *et al.* NIH Public Access. **334**, 806–809 (2012).
33. Peng, C. *et al.* The First Identification of Lysine Malonylation Substrates and Its Regulatory Enzyme * □. 1–12 (2011) doi:10.1074/mcp.M111.012658.
34. Tan, M. *et al.* Article Lysine Glutarylation Is a Protein Posttranslational

- Modification Regulated by SIRT5. 605–617 (2014)
doi:10.1016/j.cmet.2014.03.014.
35. Tsai, Y., Greco, T. M. & Cristea, I. M. Sirtuin 7 Plays a Role in Ribosome Biogenesis and Protein Synthesis * □. 73–83 (2014)
doi:10.1074/mcp.M113.031377.
 36. Ford, E. *et al.* Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. 1075–1080 (2006)
doi:10.1101/gad.1399706.GENES.
 37. Gertz, M. & Steegborn, C. Function and regulation of the mitochondrial Sirtuin isoform Sirt5 in Mammalia. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Proteins Proteomics* **1804**, 1658–1665 (2010).
 38. Lombard, D. B. *et al.* Mammalian Sir2 Homolog SIRT3 Regulates Global Mitochondrial Lysine Acetylation. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 8807–8814 (2007).
 39. Schwer, B., Bunkenborg, J., Verdin, R. O., Andersen, J. S. & Verdin, E. Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 10224–10229 (2006).
 40. Schlicker, C. *et al.* Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5. *J. Mol. Biol.* **382**, 790–801 (2008).
 41. Qiu, X., Brown, K., Hirschey, M. D., Verdin, E. & Chen, D. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metab.* **12**, 662–667 (2010).
 42. Lin, Z.-F. *et al.* SIRT5 desuccinylates and activates SOD1 to eliminate ROS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **441**, 191–195 (2013).
 43. Nakagawa, T., Lomb, D. J., Haigis, M. C. & Guarente, L. SIRT5 Deacetylates Carbamoyl Phosphate Synthetase 1 and Regulates the Urea Cycle. *Cell* **137**, 560–570 (2009).
 44. Haigis, M. C. *et al.* SIRT4 Inhibits Glutamate Dehydrogenase and Opposes the Effects of Calorie Restriction in Pancreatic b Cells. **1**, 941–954 (2006).
 45. German, N. J. *et al.* Article SIRT4 Coordinates the Balance between Lipid Synthesis and Catabolism by Repressing Malonyl CoA Decarboxylase. (2012)
doi:10.1016/j.molcel.2013.05.012.
 46. North, B. J. *et al.* Is an NAD⁺-Dependent Tubulin Deacetylase. **11**, 437–444 (2003).
 47. North, B. J. & Verdin, E. Interphase nucleo-cytoplasmic shuttling and localization of SIRT2 during mitosis. *PLoS One* **2**, (2007).
 48. Michan, S. & Sinclair, D. Sirtuins in mammals: Insights into their biological function. *Biochem. J.* **404**, 1–13 (2007).
 49. Pan, M., Yuan, H., Brent, M., Ding, E. C. & Marmorsteins, R. SIRT1 contains N-

- and C-terminal regions that potentiate deacetylase activity. *J. Biol. Chem.* **287**, 2468–2476 (2012).
50. Tanno, M., Sakamoto, J., Miura, T., Shimamoto, K. & Horio, Y. Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *J. Biol. Chem.* **282**, 6823–6832 (2007).
 51. Ahuja, N. *et al.* Regulation of Insulin Secretion by SIRT4, a Mitochondrial. **282**, 33583–33592 (2007).
 52. Sanders, B. D., Jackson, B. & Marmorstein, R. Structural basis for sirtuin function: what we know and what we don't. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Proteins Proteomics* **1804**, 1604–1616 (2010).
 53. Bellamacina, C. R. The nicotinamide dinucleotide binding motif: a comparison of nucleotide binding proteins. *FASEB J.* **10**, 1257–1269 (1996).
 54. Finnin, M. S., Donigian, J. R. & Pavletich, N. P. Structure of the histone deacetylase SIRT2. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 621–625 (2001).
 55. Jin, L. *et al.* Crystal structures of human SIRT3 displaying substrate-induced conformational changes. *J. Biol. Chem.* **284**, 24394–24405 (2009).
 56. Zhao, K., Harshaw, R., Chai, X. & Marmorstein, R. Structural basis for nicotinamide cleavage and ADP-ribose transfer by NAD⁺-dependent Sir2 histone/protein deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 8563–8568 (2004).
 57. Cosgrove, M. S. *et al.* The structural basis of sirtuin substrate affinity. *Biochemistry* **45**, 7511–7521 (2006).
 58. Feldman, J. L., Dittenhafer-Reed, K. E. & Denu, J. M. Sirtuin catalysis and regulation. *J. Biol. Chem.* **287**, 42419–42427 (2012).
 59. Gil, R., Barth, S., Kanfi, Y. & Cohen, H. Y. SIRT6 exhibits nucleosome-dependent deacetylase activity. *Nucleic Acids Res.* **41**, 8537–8545 (2013).
 60. Ahuja, N. *et al.* Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **282**, 33583–33592 (2007).
 61. Liszt, G., Ford, E., Kurtev, M. & Guarente, L. Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **280**, 21313–21320 (2005).
 62. Du, J., Jiang, H. & Lin, H. Investigating the ADP-ribosyltransferase activity of sirtuins with NAD analogues and 32P-NAD. *Biochemistry* **48**, 2878–2890 (2009).
 63. Feldman, J. L., Baeza, J. & Denu, J. M. Activation of the protein deacetylase SIRT6 by long-chain fatty acids and widespread deacylation by mammalian sirtuins. *J. Biol. Chem.* **288**, 31350–31356 (2013).
 64. Du, J. *et al.* Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science (80-.)*. **334**, 806–809 (2011).
 65. Mei, Z. *et al.* Sirtuins in metabolism, DNA repair and cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **35**, 1–14 (2016).

66. Kang, H. *et al.* Peptide switch is essential for Sirt1 deacetylase activity. *Mol. Cell* **44**, 203–213 (2011).
67. Dai, H. *et al.* Crystallographic structure of a small molecule SIRT1 activator-enzyme complex. 1–10 (2015) doi:10.1038/ncomms8645.
68. Dai, H. *et al.* Crystallographic structure of a small molecule SIRT1 activator-enzyme complex. *Nat. Commun.* **6**, 1–10 (2015).
69. Xiong, S., Salazar, G., Patrushev, N. & Alexander, R. W. FoxO1 mediates an autofeedback loop regulating SIRT1 expression. *J. Biol. Chem.* **286**, 5289–5299 (2011).
70. Chen, W. Y. *et al.* Tumor Suppressor HIC1 Directly Regulates SIRT1 to Modulate p53-Dependent DNA-Damage Responses. **123**, 437–448 (2005).
71. Flick, F. & Lüscher, B. Regulation of sirtuin function by posttranslational modifications. **3**, 1–13 (2012).
72. Buler, M., Andersson, U. & Hakkola, J. Who watches the watchmen? Regulation of the expression and activity of sirtuins. *FASEB J.* **30**, 3942–3960 (2016).
73. Zhao, K. & Zhou, Z. Post-translational modifications of nuclear sirtuins. *Genome Instab. Dis.* 1–12 (2019).
74. Buler, M., Andersson, U. & Hakkola, J. Who watches the watchmen ? Regulation of the expression and activity of sirtuins. 3942–3960 doi:10.1096/fj.201600410RR.
75. Nasrin, N. *et al.* JNK1 phosphorylates SIRT1 and promotes its enzymatic activity. *PLoS One* **4**, (2009).
76. Back, J. H. *et al.* Cancer cell survival following DNA damage-mediated premature senescence is regulated by mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent Inhibition of sirtuin 1. *J. Biol. Chem.* **286**, 19100–19108 (2011).
77. Houtkooper, R. H., Pirinen, E. & Auwerx, J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat. Rev. Mol. cell Biol.* **13**, 225–238 (2012).
78. Cantó, C. *et al.* AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* **458**, 1056–1060 (2009).
79. Chen, D. *et al.* Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction. *Genes Dev.* **22**, 1753–1757 (2008).
80. Anderson, R. M., Bitterman, K. J., Wood, J. G., Medvedik, O. & Sinclair, D. A. Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **423**, 181–185 (2003).
81. Bordone, L. *et al.* SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell* **6**, 759–767 (2007).
82. Moroz, N. *et al.* Dietary restriction involves NAD⁺-dependent mechanisms and a shift toward oxidative metabolism. *Aging Cell* **13**, 1075–1085 (2014).

83. Rogina, B. & Helfand, S. L. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 15998–16003 (2004).
84. Kim, H.-J. *et al.* Metabolomic analysis of livers and serum from high-fat diet induced obese mice. *J. Proteome Res.* **10**, 722–731 (2011).
85. Lin, S.-J., Ford, E., Haigis, M., Liszt, G. & Guarente, L. Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes Dev.* **18**, 12–16 (2004).
86. Sauve, A. A. Sirtuin chemical mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Proteins Proteomics* **1804**, 1591–1603 (2010).
87. Bitterman, K. J., Anderson, R. M., Cohen, H. Y., Latorre-Esteves, M. & Sinclair, D. A. Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J. Biol. Chem.* **277**, 45099–45107 (2002).
88. Hu, J., Jing, H. & Lin, H. Sirtuin inhibitors as anticancer agents. *Future Med. Chem.* **6**, 945–966 (2014).
89. Fischer, F. *et al.* Sirt5 deacylation activities show differential sensitivities to nicotinamide inhibition. *PLoS One* **7**, (2012).
90. Haigis, M. C. & Sinclair, D. A. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **5**, 253–295 (2010).
91. Hubbard, B. P. & Sinclair, D. A. Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* **35**, 146–154 (2014).
92. Deng, A., Ning, Q., Zhou, L. & Liang, Y. SIRT2 is an unfavorable prognostic biomarker in patients with acute myeloid leukemia. *Sci. Rep.* **6**, 1–8 (2016).
93. Donmez, G. & Outeiro, T. F. SIRT1 and SIRT2: emerging targets in neurodegeneration. *EMBO Mol. Med.* **5**, 344–352 (2013).
94. Outeiro, T. F. *et al.* Sirtuin 2 inhibitors rescue α -synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease. *Science (80-.).* **317**, 516–519 (2007).
95. Zorn, J. A. & Wells, J. A. Turning enzymes ON with small molecules. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 179 (2010).
96. Howitz, K. T. *et al.* Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* **425**, 191–196 (2003).
97. Wood, J. G. *et al.* Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* **430**, 686–689 (2004).
98. Gertz, M. *et al.* A molecular mechanism for direct sirtuin activation by resveratrol. *PLoS One* **7**, (2012).
99. Lakshminarasimhan, M., Rauh, D., Schutkowski, M. & Steegborn, C. Sirt1 activation by resveratrol is substrate sequence-selective. *Aging (Albany NY)* **5**, 151 (2013).

100. Cao, D. *et al.* Structural basis for allosteric , substrate- dependent stimulation of SIRT1 activity by resveratrol. 1316–1325 (2015) doi:10.1101/gad.265462.115.
101. You, W. *et al.* Structural basis of sirtuin 6 activation by synthetic small molecules. *Angew. Chemie Int. Ed.* **56**, 1007–1011 (2017).
102. Mai, A. *et al.* Study of 1, 4-dihydropyridine structural scaffold: discovery of novel sirtuin activators and inhibitors. *J. Med. Chem.* **52**, 5496–5504 (2009).
103. Kokkonen, P. *et al.* Studying SIRT6 regulation using H3K56 based substrate and small molecules. *Eur. J. Pharm. Sci.* **63**, 71–76 (2014).
104. You, W., Zheng, W., Weiss, S., Chua, K. F. & Steegborn, C. Structural basis for the activation and inhibition of Sirtuin 6 by quercetin and its derivatives. *Sci. Rep.* **9**, 1–11 (2019).
105. Smith, B. C. & Denu, J. M. Mechanism-based inhibition of Sir2 deacetylases by thioacetyl-lysine peptide. *Biochemistry* **46**, 14478–14486 (2007).
106. Kiviranta, P. H. *et al.* N ϵ -thioacetyl-lysine-containing tri-, tetra-, and pentapeptides as SIRT1 and SIRT2 inhibitors. *J. Med. Chem.* **52**, 2153–2156 (2009).
107. He, B., Du, J. & Lin, H. Thiosuccinyl peptides as Sirt5-specific inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 1922–1925 (2012).
108. He, B., Hu, J., Zhang, X. & Lin, H. Thiomyristoyl peptides as cell-permeable Sirt6 inhibitors. *Org. Biomol. Chem.* **12**, 7498–7502 (2014).
109. Rumpf, T. *et al.* Selective Sirt2 inhibition by ligand-induced rearrangement of the active site. *Nat. Commun.* **6**, 6263 (2015).
110. Sundriyal, S. *et al.* Thienopyrimidinone based sirtuin-2 (SIRT2)-selective inhibitors bind in the ligand induced selectivity pocket. *J. Med. Chem.* **60**, 1928–1945 (2017).
111. Nguyen, G. T. T., Schaefer, S., Gertz, M., Weyand, M. & Steegborn, C. Structures of human sirtuin 3 complexes with ADP-ribose and with carba-NAD⁺ and SRT1720: binding details and inhibition mechanism. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **69**, 1423–1432 (2013).
112. Milne, J. C. *et al.* Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature* **450**, 712–716 (2007).
113. Kwon, H.-S. & Ott, M. The ups and downs of SIRT1. *Trends Biochem. Sci.* **33**, 517–525 (2008).
114. Zhao, W. *et al.* Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1. *Nature* **451**, 587–590 (2008).
115. Kim, J.-E., Chen, J. & Lou, Z. DBC1 is a negative regulator of SIRT1. *Nature* **451**, 583–586 (2008).
116. Bae, H. J. *et al.* DBC1 does not function as a negative regulator of SIRT1 in liver

- p>
cancer.
- Oncol. Lett.*
- 4**
- , 873–877 (2012).
117. Sung, J., Kim, R., Kim, J. & Lee, J. Balance between SIRT1 and DBC1 expression is lost in breast cancer.
- Cancer Sci.*
- 101**
- , 1738–1744 (2010).
118. Hubbard, B. P.
- et al.*
- Carboxamide SIRT1 inhibitors block DBC1 binding via an acetylation-independent mechanism.
- Cell Cycle*
- 12**
- , 2233–2240 (2013).
119. Gertz, M.
- et al.*
- Ex-527 inhibits Sirtuins by exploiting their unique NAD
- ⁺
- dependent deacetylation mechanism.
- Proc. Natl. Acad. Sci.*
- 110**
- , E2772–E2781 (2013).
120. Pagans, S.
- et al.*
- SIRT1 regulates HIV transcription via Tat deacetylation.
- PLoS Biol.*
- 3**
- , (2005).
121. Kwon, H.-S.
- et al.*
- Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein inhibits the SIRT1 deacetylase and induces T cell hyperactivation.
- Cell Host Microbe*
- 3**
- , 158–167 (2008).
122. Kim, E. J., Kho, J. H., Kang, M. R. & Um, S. J. Active Regulator of SIRT1 Cooperates with SIRT1 and Facilitates Suppression of p53 Activity.
- Mol. Cell*
- 28**
- , 277–290 (2007).
123. Knight, J. R. P., Willis, A. E. & Milner, J. Active regulator of SIRT1 is required for ribosome biogenesis and function.
- Nucleic Acids Res.*
- 41**
- , 4185–4197 (2013).
124. Maeda, N., Toku, S., Kenmochi, N. & Tanaka, T. A novel nucleolar protein interacts with ribosomal protein S19.
- Biochem. Biophys. Res. Commun.*
- 339**
- , 41–46 (2006).
125. Conrad, E.
- et al.*
- HIPK2 restricts SIRT1 activity upon severe DNA damage by a phosphorylation-controlled mechanism.
- Cell Death Differ.*
- 23**
- , 110–122 (2016).
126. Knight, J. R. P., Allison, S. J. & Milner, J. Active regulator of SIRT1 is required for cancer cell survival but not for SIRT1 activity.
- Open Biol.*
- 3**
- , (2013).
127. Kokkola, T.
- et al.*
- AROS has a context-dependent effect on SIRT1.
- FEBS Lett.*
- 588**
- , 1523–1528 (2014).
128. Lakshminarasimhan, M.
- et al.*
- Molecular architecture of the human protein deacetylase Sirt1 and its regulation by AROS and resveratrol.
- Biosci. Rep.*
- 33**
- , 395–404 (2013).
129. Mullis, F.
- et al.*
- PCR a practical approach. (1986).
130. Gasteiger, E.
- et al.*
- Protein identification and analysis tools on the ExPASy server.
- proteomics Protoc. Handb.*
- 571–607 (2005).
131. Laemmli, U. ‘Relevant page on gel electrophoresis.’
- Nature*
- 227**
- , 681 (1970).
132. Niepmann, M. & Zheng, J. Discontinuous native protein gel electrophoresis.
- Electrophoresis*
- 27**
- , 3949–3951 (2006).
133. Smith, B. C., Hallows, W. C. & Denu, J. M. A continuous microplate assay for

- sirtuins and nicotinamide-producing enzymes. *Anal. Biochem.* **394**, 101–109 (2009).
134. Micsonai, A. *et al.* Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, E3095–E3103 (2015).
135. Consortium, U. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* **47**, D506–D515 (2019).
136. Jones, D. T. & Cozzetto, D. DISOPRED3: precise disordered region predictions with annotated protein-binding activity. *Bioinformatics* **31**, 857–863 (2015).
137. Romero, P. *et al.* Sequence complexity of disordered protein. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **42**, 38–48 (2001).
138. Källberg, M. *et al.* Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat. Protoc.* **7**, 1511–1522 (2012).
139. Carter, C. W. Protein crystallization using incomplete factorial experiments. *J. Biol. Chem.* **254**, 12219–12223 (1979).
140. Chaikuad, A., Knapp, S. & von Delft, F. Defined PEG smears as an alternative approach to enhance the search for crystallization conditions and crystal-quality improvement in reduced screens. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **71**, 1627–1639 (2015).
141. Rumpf, T., Gerhardt, S., Einsle, O. & Jung, M. Seeding for sirtuins: microseed matrix seeding to obtain crystals of human Sirt3 and Sirt2 suitable for soaking. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* **71**, 1498–1510 (2015).
142. Moniot, S. *et al.* Development of 1, 2, 4-oxadiazoles as potent and selective inhibitors of the human deacetylase sirtuin 2: structure–activity relationship, X-ray crystal structure, and anticancer activity. *J. Med. Chem.* **60**, 2344–2360 (2017).
143. Huschmann, F. U. *et al.* Structures of endothiapepsin–fragment complexes from crystallographic fragment screening using a novel, diverse and affordable 96-compound fragment library. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* **72**, 346–355 (2016).
144. Gerlach, M., Mueller, U. & Weiss, M. S. The MX beamlines BL14. 1-3 at BESSY II. *J. large-scale Res. Facil. JLSRF* **2**, 47 (2016).
145. Battye, T. G. G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H. R. & Leslie, A. G. W. iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **67**, 271–281 (2011).
146. Krug, M., Weiss, M. S., Heinemann, U. & Mueller, U. XDSAPP: a graphical user interface for the convenient processing of diffraction data using XDS. *J. Appl. Crystallogr.* **45**, 568–572 (2012).
147. Padilla, J. E. & Yeates, T. O. A statistic for local intensity differences: robustness to anisotropy and pseudo-centering and utility for detecting twinning. *Acta*

- Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **59**, 1124–1130 (2003).
148. McCoy, A. J. *et al.* Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674 (2007).
149. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132 (2004).
150. Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **53**, 240–255 (1997).
151. Mori, S., Abeygunawardana, C., Johnson, M. O. & Vanzijl, P. C. M. Improved sensitivity of HSQC spectra of exchanging protons at short interscan delays using a new fast HSQC (FHSQC) detection scheme that avoids water saturation. *J. Magn. Reson. Ser. B* **108**, 94–98 (1995).
152. Grzesiek, S. & Bax, A. Correlating backbone amide and side chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 6291–6293 (1992).
153. Grzesiek, S., Anglister, J. & Bax, A. Correlation of backbone amide and aliphatic side-chain resonances in ¹³C/¹⁵N-enriched proteins by isotropic mixing of ¹³C magnetization. *J. Magn. Reson. Ser. B* **101**, 114–119 (1993).
154. Kay, L. E., Ikura, M., Tschudin, R. & Bax, A. Three-dimensional triple-resonance NMR spectroscopy of isotopically enriched proteins. *J. Magn. Reson.* **89**, 496–514 (1990).
155. Grzesiek, S. & Bax, A. An efficient experiment for sequential backbone assignment of medium-sized isotopically enriched proteins. *J. Magn. Reson.* **99**, 201–207 (1992).
156. Boots, A. W., Haenen, G. R. M. M. & Bast, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur. J. Pharmacol.* **585**, 325–337 (2008).
157. You, W., Zheng, W., Weiss, S., Chua, K. F. & Steegborn, C. Structural basis for the activation and inhibition of Sirtuin 6 by quercetin and its derivatives. *Sci. Rep.* 1–11 (2019) doi:10.1038/s41598-019-55654-1.
158. Feldman, J. L. *et al.* Kinetic and structural basis for acyl-group selectivity and NAD⁺ dependence in sirtuin-catalyzed deacylation. *Biochemistry* **54**, 3037–3050 (2015).
159. Avalos, J. L., Bever, K. M. & Wolberger, C. Mechanism of sirtuin inhibition by nicotinamide: altering the NAD⁺ cosubstrate specificity of a Sir2 enzyme. *Mol. Cell* **17**, 855–868 (2005).
160. Avalos, J. L., Boeke, J. D. & Wolberger, C. Structural basis for the mechanism and regulation of Sir2 enzymes. *Mol. Cell* **13**, 639–648 (2004).
161. Deller, M. C. & Rupp, B. Models of protein–ligand crystal structures: trust, but verify. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **29**, 817–836 (2015).

162. Walker, J. M. *The proteomics protocols handbook*. (Springer, 2005).
163. Kozlowski, L. P. Proteome-pl: proteome isoelectric point database. *Nucleic Acids Res.* **45**, D1112–D1116 (2017).
164. Jones, D. T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* **292**, 195–202 (1999).
165. Abriata, L. A. A simple spreadsheet program to simulate and analyze the far-UV circular dichroism spectra of proteins. *J. Chem. Educ.* **88**, 1268–1273 (2011).
166. Kuznetsova, I. M., Turoverov, K. K. & Uversky, V. N. What macromolecular crowding can do to a protein. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 23090–23140 (2014).
167. Prestel, A., Bugge, K., Staby, L., Hendus-Altenburger, R. & Kragelund, B. B. Characterization of dynamic IDP complexes by NMR spectroscopy. in *Methods in enzymology* vol. 611 193–226 (Elsevier, 2018).
168. Williamson, M. P. Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **73**, 1–16 (2013).
169. Becker, W., Bhattiprolu, K. C., Gubensäk, N. & Zangger, K. Investigating protein–ligand interactions by solution nuclear magnetic resonance spectroscopy. *ChemPhysChem* **19**, 895 (2018).
170. Yang, L.-L. *et al.* X-ray crystal structure guided discovery of new selective, substrate-mimicking sirtuin 2 inhibitors that exhibit activities against non-small cell lung cancer cells. *Eur. J. Med. Chem.* **155**, 806–823 (2018).
171. Kudo, N., Ito, A., Arata, M., Nakata, A. & Yoshida, M. Identification of a novel small molecule that inhibits deacetylase but not defatty-acylase reaction catalysed by SIRT2. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **373**, 20170070 (2018).
172. Heger, V. *et al.* Quercetin based derivatives as sirtuin inhibitors. *Biomed. Pharmacother.* **111**, 1326–1333 (2019).
173. Cao, D. *et al.* Structural basis for allosteric, substrate-dependent stimulation of SIRT1 activity by resveratrol. *Genes Dev.* **29**, 1316–1325 (2015).
174. Pillai, V. B. *et al.* Honokiol blocks and reverses cardiac hypertrophy in mice by activating mitochondrial Sirt3. *Nat. Commun.* **6**, 1–16 (2015).
175. Nakamura, F. *et al.* Halistanol sulfates I and J, new SIRT1–3 inhibitory steroid sulfates from a marine sponge of the genus *Halichondria*. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **71**, 273–278 (2018).
176. Nguyen, G. T. T., Gertz, M. & Steegborn, C. Crystal structures of Sirt3 complexes with 4'-bromo-resveratrol reveal binding sites and inhibition mechanism. *Chem. Biol.* **20**, 1375–1385 (2013).
177. Disch, J. S. *et al.* Discovery of thieno [3, 2-d] pyrimidine-6-carboxamides as potent inhibitors of SIRT1, SIRT2, and SIRT3. *J. Med. Chem.* **56**, 3666–3679 (2013).

178. Uversky, V. N. A decade and a half of protein intrinsic disorder: Biology still waits for physics. *Protein Sci.* **22**, 693–724 (2013).
179. Demarest, S. J. *et al.* Mutual synergistic folding in recruitment of cbp/p300 by p160 nuclear receptor coactivators. *Nature* **415**, 549–553 (2002).
180. Ren, W., Ji, D. & Xu, X. Metal cofactor modulated folding and target recognition of HIV-1 NCp7. *PLoS One* **13**, 1–21 (2018).
181. Bah, A. *et al.* Folding of an intrinsically disordered protein by phosphorylation as a regulatory switch. *Nature* **519**, 106–109 (2015).
182. Darling, A. L. & Uversky, V. N. Intrinsic disorder and posttranslational modifications: The darker side of the biological dark matter. *Front. Genet.* **9**, 1–18 (2018).
183. Sharma, R., Raduly, Z., Miskei, M. & Fuxreiter, M. Fuzzy complexes: Specific binding without complete folding. *FEBS Lett.* **589**, 2533–2542 (2015).
184. Tompa, P. & Fuxreiter, M. Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein-protein interactions. *Trends Biochem. Sci.* **33**, 2–8 (2008).
185. Vincenzi, M., Mercurio, F. A. & Leone, M. About TFE: Old and New Findings. *Curr. Protein Pept. Sci.* **20**, 425–451 (2019).
186. Castello, A. *et al.* Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell* **149**, 1393–1406 (2012).
187. Armour, S. M. *et al.* A high-confidence interaction map identifies SIRT1 as a mediator of acetylation of USP22 and the SAGA coactivator complex. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 1487–1502 (2013).
188. Zhou, H. *et al.* Toward a comprehensive characterization of a human cancer cell phosphoproteome. *J. Proteome Res.* **12**, 260–271 (2013).
189. Ellis, R. J. Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 114–119 (2001).
190. Borra, M. T., Smith, B. C. & Denu, J. M. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *J. Biol. Chem.* **280**, 17187–17195 (2005).
191. Perkins, J. R., Diboun, I., Dessailly, B. H., Lees, J. G. & Orengo, C. Transient Protein-Protein Interactions: Structural, Functional, and Network Properties. *Structure* **18**, 1233–1243 (2010).
192. Ghisays, F. *et al.* The N-terminal domain of SIRT1 is a positive regulator of endogenous SIRT1-dependent deacetylation and transcriptional outputs. *Cell Rep.* **10**, 1665–1673 (2015).
193. Hubbard, B. P. *et al.* Evidence for a common mechanism of SIRT1 regulation by allosteric activators. *Science (80-.).* **339**, 1216–1219 (2013).

6 Anhang

6.1 DNA-Sequenzen

DNA-Sequenz von humanem AROS:

atgtccgcccctgtcgggcgggctggagctgctggcggtccgagggcccccgggaccctccaggtcaggccaagc
cgagaggggctccggtgaaacggccccggaagacgaaggcaattcaggcccagaaactcggaactcggccaagggaaa
gggtcccaagtcggcactggacgagtaccggaagcgagagtgtcgagaccacctcagagtaaactgaagttctgaccagg
acgagaagcaccgtggctgagctgtgagccagcagattttgcccagaaccggggccgcaaggcctgtgaccggcctgtggc
caagaccaagaagaagaaggctgagggcaccgtgttcaccgaggaagactccagaagttccagcaggaatacttcggcag
ctag

DNA-Sequenz von humanem Volllänge-Sirt1:

atggcggacgaggcggccctcgccctcagcccggcggtccccctcggcgggggggccgacagggaggccgcgtcgtcc
cccgccggggagccgctccgcaagaggccgaggagatggtcccggtcctcagcggagcccgggcgagcccggtgggg
cggccccagagcgtgaggtgccggcggcgccaggggtgccgggtgcggcgggcggtgtggcgggaggcgga
ggcagagggcggcgggcaggcggggagcaagaggccaggcgactcggcggtggggaaggagacaatggccgg
gcctgcagggcccatctcgggagccaccgtggccgacaactgtacgacgaagacgacgacgagggcgaggaggag
gaagaggcggcgggcgggcggtgggtaccgagataaccttctgttcggtgatgaaattatcactaatggtttcattcctgtgaa
agtgtgaggaggatagagcctcacatgcaagctctagtactggactccaaggccacggataggtccatatactttgttcagca
acatcttatgattggcacagatcctcgaacaattcttaagatttattgccgaaacaatacctccacctgagttggatgatagaca
ctgtggcagattgttattaatatccttcagaaccacaaaaaggaaaaaagaaaagatattaatacaattgaagatgctgtgaa
attactgcaagagtcaaaaaaattatagtttaactggagctgggtgtctgtttcatgtggaatacctgacttcagggtcaagggat
ggatattatgtctgcctgtctgtagactcccagatctccagatctcaagcgatgtttgatattgaatattcagaaaagatccaaga
ccattctcaagttgcaaaggaaatatacttggaacaattccagccatctctgtcacaattcatagcctgtcagataaggaag
gaaaactacttcgcaactataccagaacatagacacgtggaacagggtgcgggaatcaaaggataattcagtgatggttc
ctttgcaacagcatcttgctgattgttaaatacaaaagttgactgtgaagctgtacgaggagatattttaacaggtagttcctcgatgt
cctagggtgccagctgatgaaccgctgtcatgaaaccagagattgtgtttttgggtaaaatttaccagaacagttcatagag
ccatgaagtatgacaaagatgaagttgacctcctcattgttattgggtcttcctcaaagtaagaccagtagcactaattccaagttc
catacccatgaagtgcctcagatattaattaatagagaacctttgcctcatctgcattttgatgtagagctcttgagactgtgatgtc
ataattaatgaattgtcataggttaggtgggtgaatatgcaaactttgtgtaaccctgtaaagctttcagaaattactgaaaaacc
tcacgaacacaaaaagaattggcttattgtcagagttgccaccacacctctcatgtttcagaagactcaagttcaccagaaa
gaacttcaccaccagattcttcagtgattgtcacacttttagaccaagcagctaagagtaatgatgatttagatgtgtctgaatcaaa
aggttgatggaagaaaaaccacaggaagtacaaacttctaggaatgttgaaagtattgctgaacagatggaaaatccggatttg
aagaatgttggtctagtactggggagaaaaatgaaagaacttcagtggtggaacagtgagaaaatgctggcctaataagagtg
gcaaaggagcagattagtaggcggctgtatggtaatcagtatctgttttgcaccaaactcgttacattttccatggcgctgaggata
ttcagactctgaagatgacgtcttatcctctagtcttctgtggcagtaacagtgatagtgggacatgccagagtccaagtttagaagaa
cccatggaggatgaaagtgaattgaagaattctacaatggcttagaagatgagcctgatgtccagagagagctggaggagct

ggatttgggactgatggagatgatcaagaggcaattaatgaagctatatctgtgaaacaggaagtaacagacatgaactatccat
caaacaaatcatga

6.2 Aminosäuresequenzen

Aminosäuresequenz von humanem Volllänge-Sirt1:

10	20	30	40	50
MADEAALALQ	PGGSPSAAGA	DREAASSPAG	EPLRKRPRRD	GPGLERSPGE
60	70	80	90	100
PGGAAPEREV	PAAARGCPGA	AAAALWREAE	AEAAAAGGEQ	EAQATAAAGE
110	120	130	140	150
GDNGPGLQGP	SREPPLADNL	YDEDDDEGE	EEEEAAAAAI	GYRDNLLFGD
160	170	180	190	200
EIITNGFHSC	ESDEEDRASH	ASSSDWTPRP	RIGPYTFVQQ	HLMIGTDPRT
210	220	230	240	250
ILKDLLPETI	PPPELDDMTL	WQIVINILSE	PPKRKKRKDI	NTIEDAVKLL
260	270	280	290	300
QECKKIIVLT	GAGVSVSCGI	PDFRSRDGIY	ARLAVDFPDL	PDPQAMFDIE
310	320	330	340	350
YFRKDPRPFF	KFAKEIYPGQ	FQPSLCHKFI	ALSDKEGKLL	RNYTQNIDTL
360	370	380	390	400
EQVAGIQRII	QCHGSFATAS	CLICKYKVDC	EAVRGDIFNQ	VVPRCPRCPA
410	420	430	440	450
DEPLAIMKPE	IVFFGENLPE	QFHRAMKYDK	DEVDLLIVIG	SSLKVRPVAL
460	470	480	490	500
IPSSIPHEVP	QILINREPLP	HLHFDVELLG	DCDVIINELC	HLRGGEYAKL
510	520	530	540	550
CCNPVKLSEI	TEKPPRTQKE	LAYLSELPT	PLHVSEDSSS	PERTSPPDSS
560	570	580	590	600
VIVTLLDQAA	KSNDLDLVSE	SKGCMEEKPQ	EVQTSRNVES	IAEQMENPDL
610	620	630	640	650
KNVGSSTGEK	NERTSVAGTV	RKCWPNRVAK	EQISRRLDGN	QYLFLPPNRY
660	670	680	690	700
IFHGAEVYSD	SEDDVLSSSS	CGSNSDSGTC	QSPSLEEPME	DESEIEEFYN
710	720	730	740	
GLEDEPDVPE	RAGGAGFGTD	GDDQEAINEA	ISVKQEV TDM	NYPSNKS

Aminosäuresequenz von humanem AROS:

10	20	30	40	50
MSAALLRRGL	ELLAASEAPR	DPPGQAKPRG	APVKRPRKTK	AIQAQKL RNS
60	70	80	90	100
AKGKVPKSAL	DEYRKRECRD	HLRVNLKFLT	RTRSTVAESV	SQQILRQNRG
110	120	130		
RKACDRPVAK	TKKKKAEGTV	FTEEDFQKFQ	QEYFGS	

Aminosäuresequenz von humanem 6xHis-TEV-AROS:

10	20	30	40	50	60
MGHHHHHHAE	NLYFQGHMSA	ALLRRGLELL	AASEAPRDPP	GQAKPRGAPV	KRPRKTKAIQ
70	80	90	100	110	120
AQKL RNSAKG	KVPKSALDEY	RKRECRDH LR	VNLKFLTRTR	STVAESVSQQ	ILRQNRGRKA
130	140	150			
CDRPVAKTKK	KKAEGTVFTE	EDFQKFQQEY	FGS		

6.3 Vektorkarten

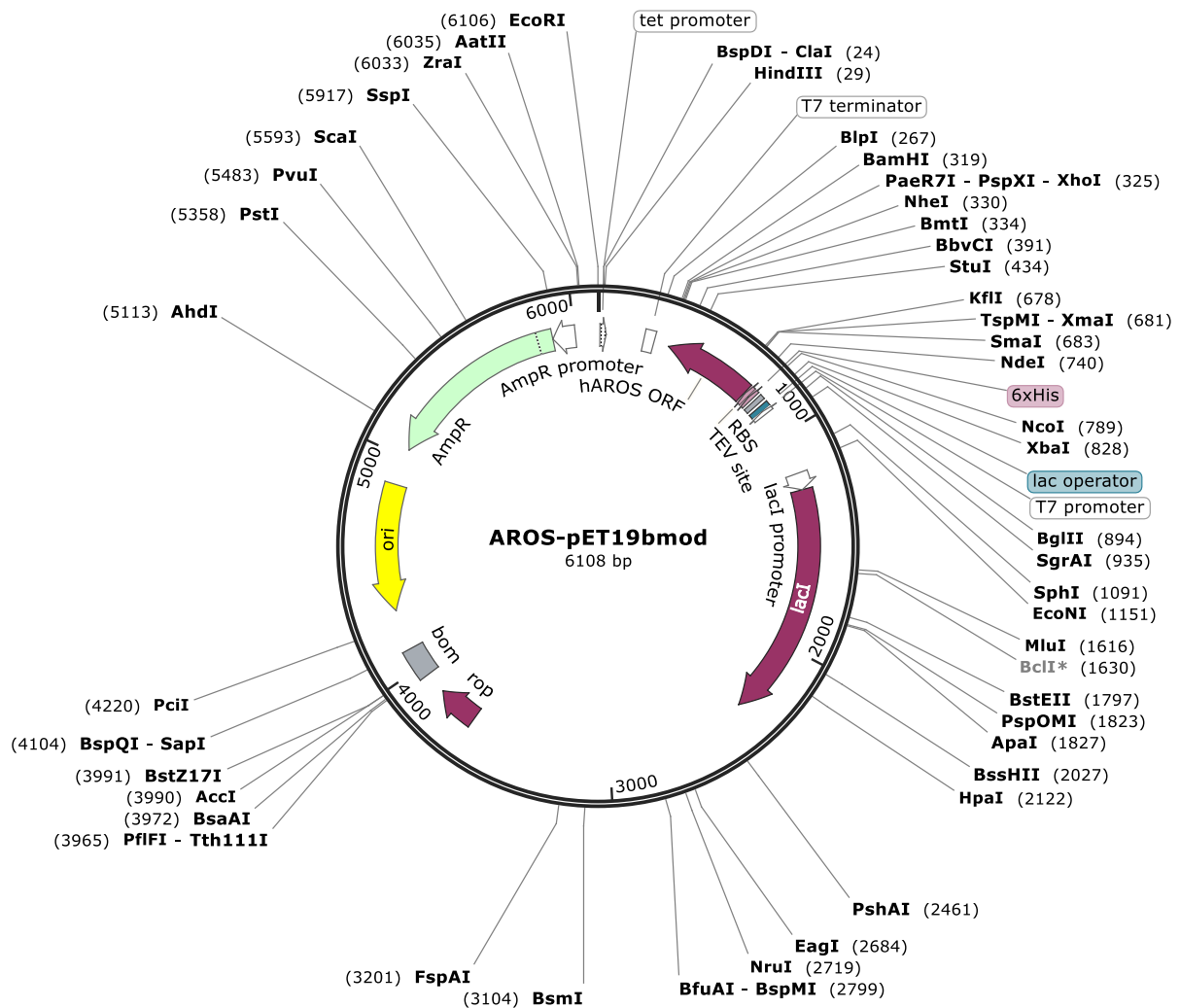


Abbildung 44 Vektorkarte von humanem AROS in einem modifizierten pET19b-Vektor (pET19bmod) mit TEV-Schnittstelle.

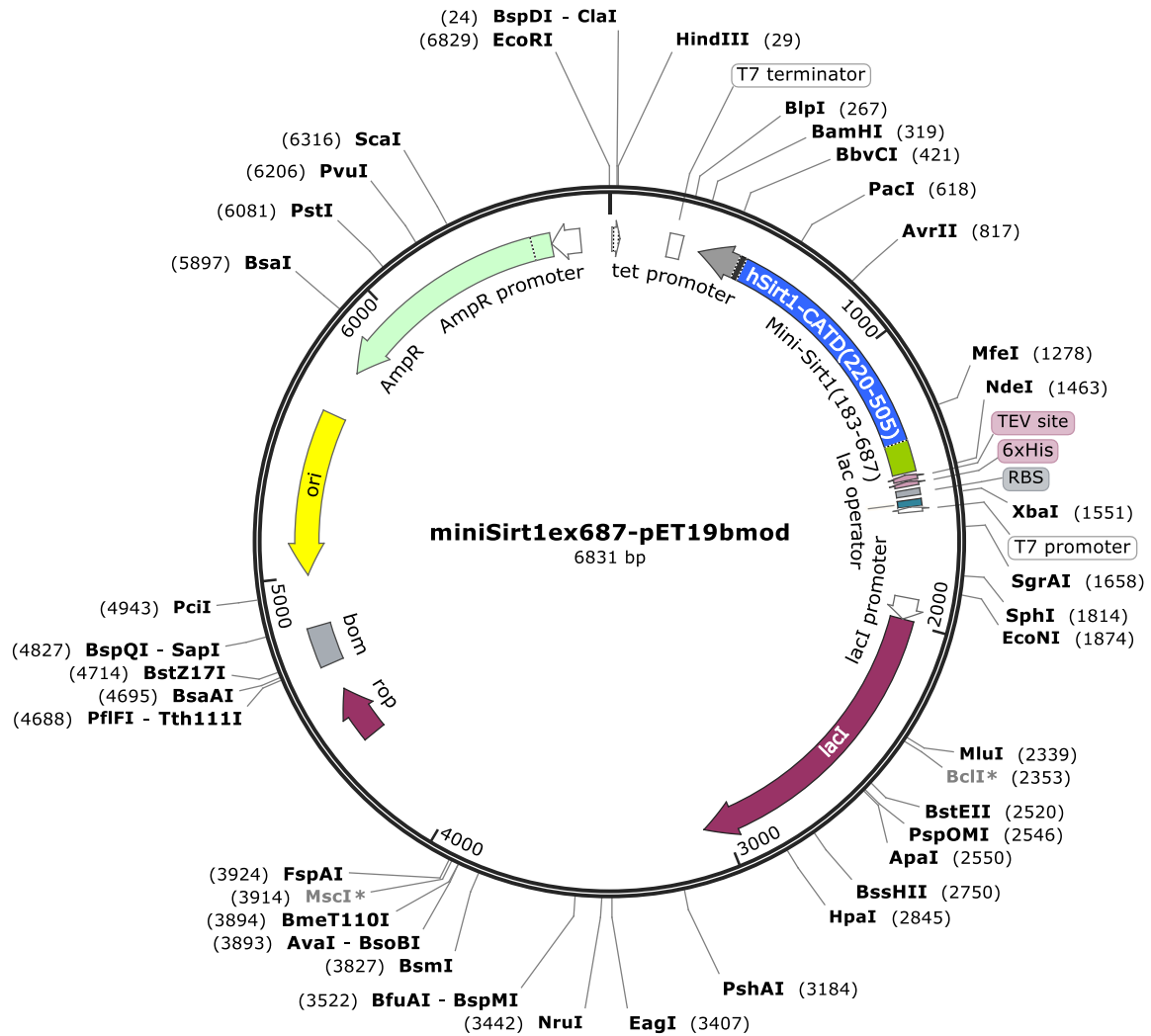


Abbildung 45 Vektorkarte des verkürzten, enzymatisch aktiven und kristallisierbare Konstrukt von humanem Sirt1, welches C-terminal um 20 Aminosäuren (miniSirt1ex687) erweitert ist, in einem modifizierten pET19b-Vektor (pET19bmod) mit TEV-Schnittstelle.

6.4 Reinigung von Sirt1-Konstrukten

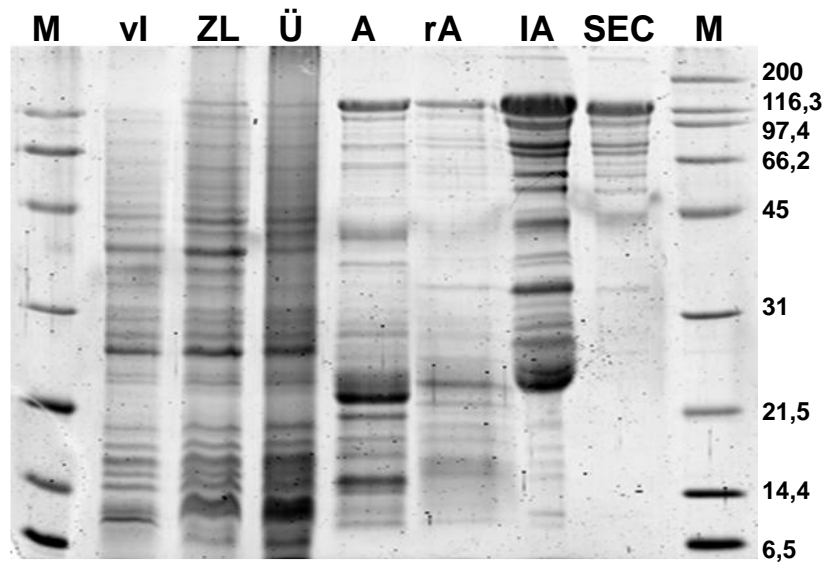


Abbildung 46 Übersicht der Reinigung von Volllänge-Sirt1. SDS-PAGE mit Proben, welche während der Reinigung genommen wurden. M: Proteinstandard mit Molekulargewichten in kDa; vl: vor Inkubation der Proteinexpression; ZL: Zellysat; Ü: Überstand nach Zellaufschluss und Zentrifugation; A: Affinitätschromatographie; rA: reverse Affinitätschromatographie nach Inkubation mit TEV-Protease; IA: Ionenaustauschchromatographie; SEC: Größenaustauschchromatographie.



Abbildung 47 Größenausschlusschromatographie von miniSirt1ex687. SDS-PAGE mit Proben, welche während der Größenausschlusschromatographie genommen wurden. M: Proteinstandard; 6-56 Bezeichnung der Fraktionen der Größenausschlusschromatographie.

6.5 Seitenkettenuordnung von AROS

Tabelle 22 Chemische Verschiebungen der Seitenkettenuordnung von 6xHis-TEV-AROS

Aminosäure ^a	$\delta^1\text{H}$ - Dimension ^b [ppm]	$\delta^{13}\text{C}_\alpha$ -Dimension ^b [ppm]	$\delta^{13}\text{C}_\beta$ -Dimension ^b [ppm]	$\delta^{15}\text{N}_\beta$ - Dimension ^b [ppm]
G	8,5615	45,247	-	108,689
G	8,4133	46,321	-	108,7166
G	8,4736	-	-	109,2302
(P)G39	8,6448	45,3724	-	109,4523
(K)G68	8,4771	45,2154	-	110,1696
(R)G45	8,5561	44,8977	-	110,6427
(E)G133	8,5994	45,2948	-	110,325
G	8,619	45,2948	-	110,439
G14	8,002	45,3742	-	108,7976
G150	7,796	45,407	-	110,259
T	8,1569	62,059	-	114,3915
(G)T134	8,1692	62,059	68,963	114,7172
(A)S31	8,2232	58,7974	-	114,6421
(A)S31	8,3802	58,559	63,833	115,103
T	8,3557	62,0539	-	116,036
(K)S73	8,574	58,55	-	116,4649
(R)S101	8,526	58,447	-	117,1726
(G)K68	8,262	56,13	33,05	121,182
(R)N64	8,589	53,58	38,65	119,99
(N)S65	8,394	63,76	58,67	116,739
(G)A46	8,302	50,54	18,09	125,25
(E)L26	8,168	56,36	42,15	127,22
(I)Q58	8,564	56,296	29,58	124,92

a: Vorgänger Aminosäure in Klammern, Position der Aminosäure in der 6xHis-TEV-AROS-Sequenz; b: Chemische Dimensionen der ^1H , ^{13}C und ^{15}N -Kerne.

Abbildung 48 Aminosäuresequenz von 6xHis-TEV-AROS mit Seitenketten, die an Sirt1-Interaktion beteiligt (Rot) bzw. nicht beteiligt (Cyan) sind.

10 20 30 40 50 60
 MGHHHHHHAE NLYFQCHMSA ALLRRGLELL AASEAPRDPP GQAKPRGAPV KRPRKTKAIQ
 70 80 90 100 110 120
 AQKLRRNSAKG KVPKSALEDEY RKRECRDHLR VNLKFLTRTR STVAESVSQQ ILRQNRGRKA
 130 140 150
 CDRPVAKTKK KKAEGTVFTE EDFQKFQQEY FCS

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen herzlich bedanken, die mich während der Promotion unterstützt und begleitet haben.

Mein Dank gilt zunächst Prof. Dr. Clemens Steegborn für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit. Vielen Dank für die konstruktiven Gespräche, das Interesse an meiner Arbeit und die wissenschaftlichen Freiheiten.

Bei dem Lehrstuhl Biochemie IV möchte mich für die großartige Zusammenarbeit bedanken. Insbesondere danke ich Prof. Dr. Birgitta Wöhl für ihr Engagement zur Förderung junger Wissenschaftlerinnen sowie ihr offenes Ohr und ihre Ehrlichkeit. Bei Dr. Kristian Schweimer und Dr. Philipp Zuber bedanke ich mich für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung in der Planung, Durchführung und Auswertung der NMR-Experimente.

Mein Dank gilt auch dem MX-Team des Helmholtz Zentrum Berlin für die spannende Kollaboration und dem immer engagierten Einsatz zu jeder Uhrzeit während der Synchrotron-Messungen.

Dr. Andrea di Fonzo, Dr. Christian Kambach, Dr. Sebastien Moniot und Dr. Michael Weyand möchte ich für die wissenschaftlichen Diskussionen und die Einführung sowie Unterstützung in die Massenspektrometrie bzw. Strukturbioologie danken.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen KollegInnen der AG Steegborn für die schöne Arbeitsatmosphäre. Lisa, Susanne, Norbert und Sabrina danke ich für die tatkräftige Unterstützung, die bereitwillige Hilfe und für alles was ihr im Labor leistet. Bei meinen BürokollegInnen Weijie und Ramona möchte ich mich für die vielen, alltäglichen Gespräche und die Unterstützung bedanken. Gabi, Anke und Renate danke ich für die immer offene Tür und, dass ihr uns den Arbeitsalltag so erleichtert. Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei all meinen StudentInnen, die ich betreuen durfte, insbesondere Tommy, für sein engagiertes Mitwirken an meinen Projekten.

Der AG Höcker und der AG Möglich danke ich für die zahlreichen Feste, sportlichen Aktivitäten und das freundschaftliche Zusammensein im Arbeitsalltag. Des Weiteren möchte ich mich bei Sooruban Shanmugaratnam für seine immer helfende Hand bedanken.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meinen CoMento-Mitstreiterinnen Marion Breunig, Eleni Milona, Theresa Schilling, Vanessa Boritzki und Julia Wollmann für die vielen gemeinsamen Stunden bedanken. Danke für die Möglichkeit in unserer kleinen, vertrauensvollen Gruppe, Raum für regen Austausch und zur persönlichen Weiterentwicklung zu haben. Ein besonderer Dank gilt außerdem meiner Mentorin Dr. Ulla Grauschopf, die mir durch ihre offene Art viele neue und spannende Einblicke gibt und mir ein Vorbild geworden ist.

Mein größter Dank gilt meinen Freunden und meiner Familie. Vielen Dank an meine Eltern, meinem Bruder und Ramona, die immer für mich da sind. Vor allem danke ich dir, Christoph, dass du mich bei allem unterstützt, immer an meiner Seite bist und für unsere wundervolle Tochter Helene.

8 (Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen

(§ 8 Satz 2 Nr. 3 PromO Fakultät)

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe (vgl. Art. 64 Abs. 1 Satz 6 BayHSchG).

(§ 8 Satz 2 Nr. 3 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe und dass ich nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden habe.

(§ 8 Satz 2 Nr. 4 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich, dass ich Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. –vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe noch künftig in Anspruch nehmen werde.

(§ 8 Satz 2 Nr. 7 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass die elektronische Fassung der Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung unterzogen werden kann.

(§ 8 Satz 2 Nr. 8 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass bei Verdacht wissenschaftlichen Fehlverhaltens Ermittlungen durch universitätsinterne Organe der wissenschaftlichen Selbstkontrolle stattfinden können.

.....
Ort, Datum, Unterschrift